

Université de Sherbrooke

Thérapie photodynamique et détection de l'apoptose

par

Nicole Cauchon

Département de médecine nucléaire et de radiobiologie

Thèse présentée à la faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de
Philosophiae doctor (Ph.D) en médecine nucléaire et radiobiologie

Avril 2006



Library and
Archives Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Published Heritage
Branch

Direction du
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 978-0-494-19016-6

Our file Notre référence

ISBN: 978-0-494-19016-6

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

Le sentier est unique pour tous, les moyens d'atteindre le but varient avec le voyageur, mais qui veut faire quelque chose trouve toujours le moyen pour surmonter les embûches croisées sur son chemin.

À ma petite famille,
À Pierre, Luc-Olivier et Krystina
pour leur compréhension et leurs encouragements

L'espérance est un petit oiseau qui se perche sur notre âme et qui chante une chanson sans paroles sans jamais se lasser. *Emily Dickinson*

Les arbres nous enseignent la patience: ils ne baissent pas les bras à la première tempête venue. *Carl Beaupré*

Le secret des réussites réside dans la judicieuse persévérance. *B. Disraeli*

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	iii
LISTE DES ILLUSTRATIONS	vii
RÉSUMÉ	xi
I. INTRODUCTION	1
I.1 Historique médical de la thérapie photodynamique en oncologie	1
I.2 Définition générale de la thérapie photodynamique	7
I.3 Mécanismes d'action de la thérapie photodynamique	8
I.4 Principaux facteurs influençant l'efficacité de la thérapie photodynamique	11
I.4.1 Lumière	11
I.4.2 Oxygène	14
I.4.3 Photosensibilisateur	17
i Définition et propriétés des phtalocyanines	19
ii Métal central	20
iii Modification structurale	21
I.5 Sélectivité et distribution	23
I.5.1 Notion d'hydrophobie et d'incorporation cellulaire	23
I.5.2 Localisation intracellulaire des photosensibilisateurs	26
I.5.3 Cibles, organelles et fonctions cellulaires	27
i Mitochondries	29
ii Lysosomes	31
iii Appareil de Golgi et réticulum endoplasmique	32
iv Membrane plasmique	33
v Noyau	35
I.6 Mécanismes de mort cellulaire induits par la TPD	36
I.6.1 Mécanismes de la nécrose passive et de l'apoptose	38

i	Nécrose	38
ii	Apoptose	39
I.6.2	Détection de l'apoptose ou de la nécrose	42
i	In vitro	42
ii	In vivo	43
I.6.3	Effets additionnels influençant la réponse tumorale	46
I.6.4	Méthodes de détection de l'apoptose	47
I.6.5	Fondements de la méthode de détection de l'apoptose <i>in vivo</i>	49
i	Approche	49
ii	Choix du radioisotope et synthèse du complexe radioactif	50
iii	Méthode de détection de l'apoptose in vivo	51
I.7	Problématique, hypothèses et objectifs de la recherche	52
I.7.1	Problématique	52
I.7.2	Hypothèses	54
I.7.3	Objectifs de la recherche	56
II	PREMIER ARTICLE	57
II.1	Buts	57
II.2	Hypothèses	57
<i>Structure-photodynamic activity relationships of substituted zinc</i>		
	<i>trisulfophthalocyanines</i>	58
	Abstract	59
	Introduction	60
	Experimental procedures	63
	Results	73
	Discussion	82
	Conclusion	82
III	DEUXIÈME ARTICLE	95

III.1 Buts	95
III.2 Hypothèses	95
<i>Photodynamic activity of substituted zinc trisulfophthalocyanines: role of plasma</i>	
<i>membrane damage</i>	96
Abstract	97
Introduction	98
Material and methods	100
Results	106
Discussion	114
Conclusion	118
IV TROISIÈME ARTICLE	125
IV.1 Buts	125
IV.2 Hypothèses	125
<i>PET imaging of apoptosis with ⁶⁴Cu-labelled streptavidin following pretargeting of</i>	
<i>phosphatidylserine with biotinylated annexin-V</i>	126
Introduction	128
Materials and methods	130
Results	138
Discussion	149
Conclusion	153
V. DISCUSSION	160
V.1 Relation entre l'hydrophobie d'une série de dérivés du ZnPcS₃C_n; potentiel	
photodynamique et mécanismes de mort cellulaire.	160
V.1.1 Raisons motivant la synthèse du ZnPcS ₃	160
V.1.2 Modulation de l'hydrophobie des ZnPc ₃	161
V.1.3 Évaluation du niveau d'hydrophobie des différents ZnPcS ₃ C _n	162

V.1.4 Méthodes usuelles mesurant le niveau d'hydrophobie	163
V.1.5 Principaux effets de l'hydrophobie	164
V.1.6 Impact de la structure chimique sur la localisation intracellulaire des ZnPcS_3C_n	167
V.1.7 Relation entre la structure chimique et l'activité photodynamique des ZnPcS_3C_n	169
V.2 Activité photodynamique d'une série de dérivés du ZnPcS_3C_n: rôle de la membrane plasmique	170
V.2.1 Accumulation des dérivés ZnPcS_3C_n dans la membrane plasmique	170
V.2.2 Effet de la structure chimique sur la distribution membranaire des ZnPcS_3C_n	171
V.2.3 Dommages induits à la membrane plasmique durant la TPD	171
V.2.4 Implication de la membrane plasmique dans la relation entre la structure chimique et l'activité photodynamique	173
V.2.5 Rôle de la membrane plasmique en TPD	174
V.3 Imagerie TEP de l'apoptose dans un modèle tumoral animal: ciblage avec l'annexine-V biotinée et ^{64}Cu-DOTA-biotine-SAv	175
V.3.1 Sélection de la méthode d'induction de l'apoptose	175
V.3.2 Principales différences entre ZnPcS_2 et AlPcS_2	176
V.3.3 Marquage du complexe radioactif	178
V.3.4 Rendements obtenus	179
V.3.5 Détection <i>in vitro</i> et <i>ex vivo</i> de l'apoptose par ^{64}Cu -DOTA-biotin-SAv	180
V.3.6 Optimisation de l'approche par pré-ciblage	181
V.3.7 Distribution du ^{64}Cu -DOTA-biotin-SAv dans notre modèle animal	182
V.3.8 Détection <i>in vivo</i> de l'apoptose par notre méthode de pré-ciblage	183
V.3.9 Résultats obtenus par imagerie TEP	184
V.3.10 Potentiel clinique de cette méthode en oncologie	185
VI CONCLUSION	187
RÉFÉRENCES	191

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Tableau I.1 :	Caractéristiques des principaux PS pour la TPD	3
Tableau I.2 :	Avancement clinique des PS.....	6
Figure I.1:	Mécanismes d'excitation du PS.....	9
Figure I.2:	Mécanismes d'action de la TPD	10
Figure I.3:	Développement de zones hypoxiques permanentes et transitoires dans une tumeur.....	16
Figure I.4 :	Structure typique d'un phtalocyanine	20
Figure I.5:	Effet de la localisation intracellulaire des PS sur l'induction des voies apoptotiques par TPD	27
Tableau I.3 :	Propriétés des sondes fluorescentes utilisées pour déterminer la localisation intracellulaire des PS	29
Figure I.6 :	Les voies apoptotiques de la mort cellulaire programmée.....	39
Figure I.7:	Schéma des voies apoptotiques: intrinsèque et extrinsèque.....	41
Figure I.8 :	Schéma représentant la régression tumorale in vivo	44
Scheme II.1:	Chemical synthesis of $ZnPcS_3C_n$	64
Table II.1:	n-Octanol/water partition coefficients (P), reversed-phase HPLC retention times (R_T), tryptophan photooxidation yields (HPPI) and monomer concentration of PcS in various solvents.	73
Figure II.2:	Absorption spectra.....	75
Figure II.3:	Comparison of EMT-6 cell phototoxicity (LD_{90} and LD_{50} in $J\ cm^{-2}$) and cell uptake (in nmole Pc/mg protein) of a series of ZnPcS derivatives	78
Figure II.4:	Comparative intracellular localization of ZnPcS derivatives (10 μ M) in EMT-6 cells after incubation for 3h with various tracker dyes.....	80
Table II.2:	Phototoxicity and EMT-6 cell uptake of a series of ZnPcS derivatives.	81
Scheme III.1:	ZnPcS chemical structures.....	100

Figure III.1 A:	Internalization of TMA-DPH by EMT-6 cells. (1 heure).....	107
Figure III.1 B:	Internalization of TMA-DPH by EMT-6 cells. (24 heures).....	108
Figure III.2:	TMA-DPH relative fluorescence intensity in EMT-6 cells (total).....	110
Figure III.3:	TMA-DPH relative fluorescence intensity in EMT-6 cells (internalisé).....	112
Table III.1:	Effect of ZnPcS structural modifications on EMT-6 cell uptake, phototoxicity and membrane permeability after PDT	112
Figure III.5:	EMT-6 cell phototoxicity after PDT, TMA-DPH uptake rate and ZnPcS cell uptake with a series of ZnPcS as a function of relative hydrophobicity. .	117
Figure IV.1	Three-step synthesis of ^{64}Cu -DOTA-biotin-SAv.	132
Figure IV.2	SDS-PAGE analysis of ^{64}Cu -DOTA-biotin and ^{64}Cu -DOTA-biotin-SAv.	138
Figure IV.3	Detection of apoptosis with fluorescent-SAv and ^{64}Cu -DOTA-biotin-SAv. ..	140
Figure IV.4	Fragmentation of DNA	141
Table IV.1	Effect of the delay time between PDT and the administration of biotinylated anxV on the ^{64}Cu -tumor uptake ratio.	143
Figure IV.5	Plasma clearance of ^{64}Cu -DOTA-biotin-SAv.....	144
Figure IV.6	The biodistribution of ^{64}Cu -DOTA-biotin-SAv.....	147
Figure IV.7	PET image slices through the treated and reference tumors	148
Figure V.1:	Variation du log (p)(A) et le temps de rétention (B) en fonction du nombre de carbones de la chaîne alkynyle.	164
Tableau V.1 :	Principales propriétés de ZnPcS_2 et de AlPcS_2	177
Figure V.2 :	Spectres HPLC.....	178

LISTE DES ABRÉVIATIONS : ANGLAIS (FRANÇAIS)

AlOHPcS ₄	Aluminum tetrasulfophthalocyanin
Anx	Annexin (annexine)
AnxV	Annexin V (annexine V)
Av	Avidin (avidine)
BSA	Bovine serum albumin (albumine du serum de bœuf)
ClAlPcS	Chloro-aluminum sulfophthalocyanin
CRM	Cremophor EL
DMF	Dimethylformamide
DOTA	1,4,7,10-tetraazacyclododecane- <i>N,N',N'',N'''</i> -tetraacetic acid
DPH	1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
FBS	Fetal bovine serum (sérum de bœuf fœtal)
HBSS/HEPES	Hanks' Balanced Salt Solution/N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethane sulfonic acid
HPPI	3 α -hydroperoxy-1,2,3,3 α ,8,8 α -hexahydropyrrolo[2,3 β]indole-2-carboxylic acid;
LD ₅₀	Light dose required to inactivate 50% cells at a given drug dose
LD ₉₀	Light dose required to inactivate 90% cells at a given drug dose
LDL	Low density lipoprotein (lipoprotéine de faible densité)
MPcs	metallo phthalocyanin (métallo-phthalocyanine)
MPcS ₂	metallo disulfonated phthalocyanin (métallo-disulfophthalocyanine)
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide
PBS	Phosphate-buffered-saline (tampon phosphate salin)
Pc	Phthalocyanine (Phtalocyanine)

Pcs	Phthalocyanines (Phtalocyanines)
PcS	Sulfonated phthalocyanine (Sulfophtalocyanine)
PDT/TPD	Photodynamic therapy (thérapie photodynamique)
Pser	Phosphatidylserin (Phosphatidylsérine)
PS	Photosensitizer ou photosensibilisateur
ROS	Oxygen species (espèces radicalaires de l'oxygène)
SAv	Streptavidin (streptavidine)
PET/TEP	Positron emission tomography/Tomographie par emission de posi- trons)
TMA-DPH	1-[4(trimethylamino)phenyl]-6-phenylhexa-1,3,5-triene
TMAP-DPH	(N-((4-(6-phenyl-1,3,5-hexatrienyl)phenyl)propyl) trimethylammo- nium p-toluenesulfonate)
t_R	Retention time on C-18 reverse-phase HPLC (temps de rétention)
ZnPc	Zinc phthalocyanine (phtalocyanine de zinc)
ZnPcs	Zinc phthalocyanines (phtalocyanines de zinc)
ZnPcS	Sulfonated ZnPc,
ZnPcS ₂	Disulfonated ZnPc;
ZnPcS ₃ C _n	Alkynyl-substituted zinc trisulfonated phthalocyanines,
ZnPcS ₃	Trisulfonated zinc phthalocyanine
ZnPcS ₃ C ₂	Ethynyl-ZnPcS ₃
ZnPcS ₃ C ₆	Hexynyl-ZnPcS ₃
ZnPcS ₃ C ₉	Nonynyl-ZnPcS ₃
ZnPcS ₃ C ₁₂	Dodecynyl-ZnPcS ₃
ZnPcS ₃ C ₁₆	Hexadecynyl-ZnPcS ₃

RÉSUMÉ

Les métallo-sulfophtalocyanines sont des photosensibilisateurs (PS) prometteurs pour la thérapie photodynamique (TPD). Le potentiel photodynamique de ces produits dépend grandement de leurs propriétés amphiphiliques. L'ajout d'un substituant lipophile sur le quatrième anneau benzylique du sulfophtalocyanine (PcS) modifie son hydrophobie globale. L'insertion d'une chaîne d'hydrocarbure de longueur variable module le degré d'hydrophobie. Pour identifier les caractéristiques optimales des ZnPcS, nous avons synthétisé une série de dérivés alkynyl du zinc trisulfophtalocyanines (ZnPcS_3C_n) et comparé leurs propriétés amphiphiliques à un nombre de paramètres apparentés à leur potentiel photodynamique. L'hydrophobie, l'incorporation cellulaire et la phototoxicité de cinq ZnPcS_3 substitués avec une chaîne de 2 à 16 carbones ont été analysées et comparées aux ZnPcS_3 et ZnPcS_2 non substitués afin de déterminer les principaux facteurs influençant l'activité photodynamique. La membrane plasmique influence-t-elle la relation entre l'hydrophobie et l'activité photodynamique? Afin d'élucider le rôle de membrane plasmique, nous avons posé l'hypothèse que l'internalisation des ZnPcS dépendait du degré d'hydrophobie et de la perméabilité sélective de la membrane plasmique. Nous avons utilisé le marqueur fluorescent (TMA-DPH) comme indicateur pour visualiser la distribution sub-membranaire de la série de ZnPcS_3C_n et pour détecter les modifications de la perméabilité membranaire avant et après TPD pour chacun des ZnPcS.

L'apoptose (mort cellulaire programmée) joue un rôle important dans la pathophysiologie de plusieurs maladies incluant le cancer. Sa détection pourrait être un atout pour évaluer l'efficacité des traitements. Les dérivés radioactifs de l'an-

nexine-V (AnxV) sont exploités en raison de l'affinité de l'annexine (Anx) pour la phosphatidylsérine (PSer), un marqueur de la surface des cellules apoptotiques. Nous décrivons une méthode de pré-ciblage en trois étapes pour la détection de l'apoptose par tomographie d'émission de positrons (TEP) utilisant le ^{64}Cu -DOTA-biotine-Streptavidine (^{64}Cu -DOTA-biotine-SAv) comme traceur. Cette méthode se base sur l'affinité de la streptavidine (SAv) pour la biotine. L'apoptose est induite par TPD dans un modèle tumoral, en utilisant un laser et des métallo-disulfophtalocyanines (MPcS₂) comme PS. Les cellules apoptotiques sont pré-ciblées avec l'anx-V biotinée après TPD, suivies 2 heures plus tard par une clairance avec l'avidine (Av) pour réduire le niveau des composés biotinés libres. Après une autre période de 2 heures, le ^{64}Cu -DOTA-biotine-SAv est injecté dans la veine de la queue de l'animal. L'imagerie débute 30 minutes après cette injection pour une durée maximale de 9 heures.

Nos résultats confirment les faits suivants: a) l'hydrophobie des ZnPcS₃C_n augmente en fonction de la longueur de la chaîne alkynyl, favorise la dimérisation et réduit la capacité de produire de l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$), b) l'hydrophobie influence le rapport monomère/dimère des ZnPcS dans les différents solvants, c) l'amphiphilie joue un rôle significatif dans le pouvoir photodynamique, d) ZnPcS₃ substitué avec une chaîne de 6 ou 9 carbones donnent des composés alternatifs au ZnPcS₂, e) la relation entre l'hydrophobie des ZnPcS et leur activité photodynamique est complexe et dépend de plusieurs facteurs inter connectés, f) le taux d'internalisation de TMA-DPH serait un bon indicateur du degré d'hydrophobie des ZnPcS, g) la membrane plasmique est une cible importante pour la TPD pouvant expliquer la relation entre l'hydrophobie et l'activité photodynamique, h) la SAv marquée avec ^{64}Cu par l'intermédiaire d'un complexe biotine DOTA conserve son

affinité pour anx V, i) l'emploi d'une forme biotinée non radioactive de l'anx V combinée avec un PET traceur permet une grande flexibilité d'adaptation de ce procédé à différents protocoles de traitement, j) cette approche d'imagerie peut être utilisée comme méthode alternative au ^{99m}Tc -anx V pour visualiser l'apoptose dans de nombreuses applications médicales et afin d'étudier les différences dans les mécanismes d'action.

I. INTRODUCTION

I.1 Historique médical de la thérapie photodynamique en oncologie

Les civilisations anciennes connaissaient et utilisaient les effets bénéfiques de la lumière et des extraits de psoralène (*Psoralea corylifolia*) pour traiter les maladies de la peau (Allison et al., 2004). Mais la découverte des réactions photochimiques dépendantes de la présence de l'oxygène (O_2) résulte des travaux d'Oscar Raab sur les paramécies en 1897 (Acroyd et al., 2001). Après la publication des travaux de Raab, von Tappeiner étudia le procédé de photosensibilisation afin d'affirmer l'implication de l' O_2 et réalisa les premiers essais cliniques avec une solution topique d'éosine pour traiter le cancer de la peau. Joldbauer et von Tappeiner ont ensuite introduit, en 1904, le terme "photodynamische Wirkung" pour décrire le procédé impliquant une action de l' O_2 , d'un PS et de la lumière. Ce terme allemand fut ensuite traduit en français par "action photodynamique" (Allison et al., 2004; Acroyd et al. 2001; Moan et Peng, 2003).

La période de 1907 à 1960 fut consacrée à la recherche fondamentale pour élucider le mécanisme de photosensibilisation et effectuer les premiers essais cliniques avec l'hématoporphyrine (Hp) chez la souris, le cochon d'inde et l'homme. À cette étape du développement de la thérapie photodynamique (TPD), l'inconvénient majeur de l'Hp se situait au niveau de la dose injectée. L'accumulation tumorale requise pour obtenir un effet phototoxique nécessitait une dose équivalente à 1g, ce qui était inacceptable d'un point de vue clinique. Des résultats favorables avec l'utilisation de l'Hp ont été rapportés mais le nombre minime de patients traités et l'absence de suivi à long terme ont retardé son application clinique en oncologie (Allison et al., 2004a; Acroyd et al. 2001; Moan et Peng, 2003).

En 1960, Lipson et ses collègues démontrèrent que les impuretés dans l'Hp provoquaient une réduction importante de l'effet photodynamique et une instabilité du produit (Huang, 2005). Les travaux de ce groupe de recherche portaient sur la purification de l'Hp ayant comme but ultime une augmentation de la concentration d'isomères actifs du mélange. Le dérivé final (HpD) démontrait une amélioration significative de l'activité photodynamique incluant une réduction importante de la dose requise. Cette amélioration ranima l'intérêt clinique de la TPD. De ce moment jusqu'en 1980, les chercheurs étudièrent intensivement les propriétés fluorescentes de l'HpD. Cette période a été utile pour démontrer l'efficacité clinique de la thérapie en oncologie et d'en soulever ses forces et faiblesses. L'ère moderne de la TPD débuta avec la découverte de la Photofrin®, une forme plus évoluée de HpD (sans monomère) qui fut la première médication éprouvée en clinique (Huang, 2005; Allison et al., 2004b; Dougherty et al., 1998).

Les premières études cliniques avec la Photofrin® et la Photohem (analogue russe de la Photofrin®) démontrent un effet thérapeutique prononcé mais exige une forte dose solubilisée dans un solvant organique et provoque une accumulation importante dans les cellules de la peau causant une photosensibilisation cutanée de 4-6 semaines. En 1992, le Ministère de Santé de la Russie a approuvé l'utilisation clinique de la Photohem et commença son investigation clinique. De 1992 à 1996, 1500 patients furent traités en Russie et un effet thérapeutique prononcé fut observé chez 91 % des malades dont une réduction tumorale totale pour 62 % et partielle pour 29 %. Ces premiers essais cliniques démontraient l'efficacité de la TPD et rapportaient plusieurs restrictions à l'utilisation du Photofrin®. À partir de ce moment, il est devenu évident que l'acceptation du protocole nécessiterait de nouveaux PS avec des propriétés physi-

cochimiques améliorées (tableau I.1) (Allison et al, 2004b; Dougherty et al., 1998; Nowis et al, 2005; van Lier, 1990; Allen et al, 2001).

Tableau I.1 : Caractéristiques des principaux PS pour la TPD (Nowis et al., 2005)

Photosensibilisateur	Longueur d'onde (nm)	coefficient d'extinction ($M^{-1} cm^{-1}$)	Mode de délivrance	Véhicule de délivrance	Dose topique ($mg kg^{-1}$)	Dose de lumière ($J cm^{-2}$)	Temps après injection	Photosensibilité de la peau	Commentaires
Haematoporphyrin-derivative	630	3.0×10^3	IV ou crème	Dextrose 5%	2.0-5.0	100-200	24-48 h	2-3 mois	Le photosensibilisateur le plus fréquemment utilisé, approuvé en clinique dans le traitement de plusieurs type de cancer
5-Aminolaevulinic acid (protoporphyrin IX)	635	$< 5 \times 10^3$	Crème, orale or IV	Soluble (eau)	< 60 (orally) < 30 (IV)	100-200	-	1-2 jours	Précurseur converti dans la mitochondrie en protoporphyrine IX
Verteporfin	690	3.5×10^4	IV	Liposomale	0.1-2.0	100-200	30-150 min	3-5 jours	Concentration tumorale suffisante après 30 minutes, clairance rapide, faible photosensitivité de la peau et approuvé pour le traitement de la dégénérescence maculaire
Tin etiopurpurin	660	2.8×10^4	IV	Émulsion lipidique	1.0-2.0	100-200	24 h	jusqu'à 1 mois	Photosensitivité cutanée importante
Temoporfin	652	3.0×10^4	IV	PEG/éthanol eau	0.1-0.3	8-12	24-48 h	jusqu'à 6 semaines	Phototoxicité élevée exigeant de très faible dose de drogue et de lumière
Texaphyrins	732	4.2×10^4	IV	Soluble (eau)	0.6-7.2	150	3-5 h	minimale	Stabilité augmentée, pénétration très profonde des tissus, stages cliniques avancés en cardiologie, aucune photosensitivité de la peau
Phthalocyanines	670-680	2.5×10^5	IV	Liposomale ou Soluble (eau)	0.5-2.0	100	24-72 h	8-10 jours	Bonne stabilité, pénétration très profonde des tissus, stage clinique avancée en cardiologie
Naphthalocyanines	750-780	$> 10^5$	IV	Liposomale	-	-	-	-	
N-aspartyl chlorin e6	664	4.0×10^4	IV	Soluble (eau)	0.5-3.5	25-100	4 h	3-7 days	Accumulation rapide dans les tumeurs
Porphyrenes	630	5.2×10^4	crème	Liposomale	1.0-3.0	-	n/a	-	
Hypericin	595	4.4×10^4	crème	Liposomale	-	-	24 h	-	Faible pénétration de la lumière, utilisé principalement pour le traitement du psoriasis et des cancers superficiels de la peau

Pendant que la Photofrin® acquiert son approbation clinique vers 1993, on assiste à l'apparition de nombreux représentants d'une seconde génération de PS. Pour leur part, les phtalocyanines (Pcs) furent les premiers PS introduits après les porphyrines et constituent des composés très attirants en raison de leurs propriétés photophysi-

ques et photochimiques avantageuses. De plus, l'addition des groupements sulfonates à la périphérie du Pc augmente considérablement la solubilité de ces composés et leur succès comme agent de la TPD. Beaucoup d'efforts ont été consacrés afin d'élucider les mécanismes d'action et de réponses tumorales (van Lier, 1990).

De 1990 jusqu'à nos jours, le groupe de recherche en Sciences des Radiations de l'Université de Sherbrooke a publié plusieurs études démontrant le potentiel photodynamique de nombreux types de PcS sur de nombreuses lignées cellulaires (*in vitro*) et modèles tumoraux (*in vivo*) (van Lier, 1990; Allen et al., 2001; Allen et al, 2002; Brasseur et al., 1988), tandis que les chercheurs du département de Radiation et d'oncologie de l'université de Cleveland vantent les mérites de leur représentant vedette, un Pc de silice nommé Pc4 (Allen et al., 2001; He et al., 1997; George et al., 2005).

De 1992 à 1995, le centre de l'Académie russe des sciences médicales et de l'Académie médicale de Moscou a traité avec succès 42 patients avec le Photosense, une solution de sulfophthalocyanine d'aluminium. Des cancers de la peau, du sein, du poumon, gastro-intestinal ainsi que celui de la tête et du cou ont été traités avec succès en utilisant des doses de Photosense de 0.5 à 1 mg/kg (Lukyanets, 1999). Ces études ont révélé une régression tumorale chez 50% des patients tandis que 43% montraient une réponse partielle mais 7% ne présentaient aucune réponse. Pour le cancer de peau non malin, le Centre de recherches d'état de Moscou rapporte une réponse tumorale complète de 85% au traitement Photosense-TPD. À la fin de l'an 2000, la compagnie suisse (Ciba-Geigy Ltd) et son associé canadien (QLT PhotoTherapeutics) ont développé leur préparation liposomale du ZnPc (CGP55847) et entreprirent depuis peu une investigation clinique sur des patients avec des carcinomes du tractus digestif (Ochsner, 1996).

Grâce à la collaboration d'équipes pluridisciplinaires et de nouvelles perspectives cliniques, la TPD est maintenant approuvée pour l'utilisation de la Photofrin® dans 40 pays dont les États-Unis, le Canada, la Russie et le Japon pour traiter plusieurs types de cancer dont ceux de la peau, de la tête et du cou, de la vessie, des poumons, du sein et d'autres organes reproducteurs. De plus, le Photosense a été récemment approuvé en Russie (Allison et al., 2004a) et un grand nombre d'autres PS de seconde génération sont présentement en essais cliniques (tableau I.2) (Allison et al, 2004 a et b; Acroyd et al. 2001; Moan et Peng, 2003; Dougherty et al., 1998; van Lier, 1990; Mitton et Ackroyd, 2005).

L'efficacité de la TPD en oncologie n'est plus mise en doute. Une limitation sérieuse de cette thérapie est la difficulté de réaliser une exposition efficace de tout le corps (Acroyd et al, 2001). Néanmoins pour des maladies avancées, la TPD démontre une certaine efficacité contre les tumeurs pré malignes et malignes mais présentement elle ne procure qu'amélioration de la qualité de vie et la longévité. Pour la forme précoce et localisée du cancer, la TPD peut être très sélective et curative.

Tableau I.2 : Avancement clinique des PS (Moan et Peng, 2003; Brown et al., 2004).

Compagnie	Photosensibilisateur	nom commercial	Application clinique	Statut clinique
Axcan Pharma	Haematoporphyrin-derivative	Photofrin®	Cancer de l'oesophage, du poumon premier et avancé stage, de la vessie, gastrique superficiel et cervical, dysplasie cervicale	Approuvé dans 40 pays
	Haematoporphyrin-derivative	Photofrin®	Cancer de la tête et du cou, du cerveau, intestinal, poumon, peau, vessie et sein métastatique, le sarcome de Kaposi, l'oesophage de Barrett, tumeurs intrathoraciques et intrapéritonéales, le psoriasis, restenose artériel	Phase I/II Phase III
Stale Research Centre for Laser Medicine (Russia)	Haematoporphyrin derivative	Photoheme	Cancer de la peau, sein, oropharynx, poumon, larynx et gastrointestinal, psoriasis et l'opacité des greffes cornéennes	Approuvé
DUSA Pharmaceuticals	5-Aminolaevulinic acid (ALA)	Levulan®	Kératose actinique (usage topique)	Approuvé
PhotoCure AS	Methyl 5-Aminolaevulinic acid (ALA)	P1202	Cancer de peau, oesophageal et gastro-intestinal, ablation endometrial, psoriasis et l'oesophage de Barrett	Preclinical
			Détection du cancer de la vessie	Phase I-II
			Kératose actinique (usage topique) et carcinome des cellules basales	Approuvé
QLT PhotoTherapeutics and Novartis Ophthalmics	Benzoporphyrin derivative monoacid (BDP-MA)	Verteporfin	Autres lésions de la peau	Phase III
			Dégénérescence maculaire	Approuvé
			Cancer de la peau sans mélanome et psoriasis	Phase I/II
Miravant Medical Technologies	Tin etiopurpurin	Purlytin™	Carcinomes des cellules basales	Phase III
			Arthrite rhumatoïde et psoriasis, sclérose en plaques, l'oesophage de Barrett, ablation endometrial, purge de moelle	Préclinique
			Dégénérescence maculaire	Phase III
Scotia Pharmaceuticals	Temoporfin	Foscan®	Cancer du sein métastatique, cutané et le sarcome de Kaposi	Phase II/III
			Cancer prostatique	Phase I
			Cancer palliatif de la tête et du cou	Approuvé
Pharmacyclics	Texaphyrins	Lutrin™ Antrin™ Optrin™	Cancer de la poitrine, gastrointestinal et du pancréas	Phase II
			Cancer oesophageal et oesophage de Barrett, thérapie adjuvante pour les cancers avancés	Phase I/II
			Cancer du sein récurrent	Phase II
Ciba-Geigy	Phthalocyanine	CGP55847	Cancer gastrique et de la prostate	Préclinique
			Cancer du sein	Phase II
State Research Centre NIOPIK (Russia)	Phthalocyanine	Photosense	Angioplastie	Phase I
V.I. Technologies	Phthalocyanine	Pc4	Dégénérescence maculaire	Phase I
MeijiSeika Kaisha Ltd & Light Sciences Corporation	N-aspartyl chlorin e6	NPc6	Types variés de tumeurs solides de la peau, du sein, des poumons, gastrointestinal etc...	Phase III
Theratechnologies			Cancer de la peau, sein, oropharyngeal, poumon, larynx et gastrointestinal, psoriasis	Approuvé en Russie
Pacific Pharmaceuticals Inc.	Boronated porphyrin	BOPP	Cancer du poumon (premier stage)	Phase III
Vim Rx Pharmaceuticals	Hypericin	-	Tumeurs solides dans la tête et le cou, poumon rectum, prostate, etc...	Phase II
			Cancer du poumon endobronchial et malignité cutanée	Phase I

Son avancement clinique exige l'utilisation de lasers plus performants pour obtenir une pénétration plus profonde de la lumière dans les tissus. L'emploi de fibre optique couplée avec d'autres systèmes d'endoscopie pourra permettre dans un avenir rap-

proché une livraison précise de la lumière à la plupart des parties du corps. On doit aussi augmenter l'accumulation intracellulaire des drogues et leur spécificité contre les cellules tumorales. Plusieurs stratégies sont présentement testées pour augmenter l'accumulation du PS dans les cellules tumorales dont une modification précise de la structure chimique du PS ou une incorporation du PS dans des véhicules comme les liposomes. L'augmentation de la spécificité tumorale pourrait être réalisée par la conjugaison des PS avec des anticorps ou des peptides ciblant des récepteurs spécifiques des cellules cancéreuses. Donc, les PS découlant de ces deux stratégies formeront, dans un avenir rapproché, une troisième génération qui devrait améliorer l'efficacité globale de la TPD

I.2 Définition générale de la thérapie photodynamique

La TPD est une thérapie photochimique basée sur l'action concertée de trois facteurs inoffensifs; la lumière visible, le PS et l' O_2 . Une première étape permet une accumulation du PS dans les cellules tumorales (*in vitro*) ou bien dans la tumeur (*in vivo*). Une seconde étape vise l'excitation du PS par une lumière d'énergie appropriée pour atteindre un état d'excitation hautement énergétique (triplet). La molécule excitée peut ensuite subir des réactions photochimiques avec les molécules biologiques environnantes ou l' O_2 moléculaire produisant soit des radicaux oxydatifs ou de l' 1O_2 (Allen et al., 2001; Sharman et al., 1999). Ces espèces réactives induisent des dommages cytotoxiques assez sévères pour causer la mort cellulaire. La sélectivité de la TPD provient notamment de l'accumulation sélective du PS dans les tissus malades et de l'illumination restreinte à la région affectée.

I.3 Mécanismes d'action de la thérapie photodynamique

Depuis 1930, les chercheurs tentent de démystifier le mécanisme d'action de l'effet photodynamique. Kautski fut le premier à démontrer par des expériences simples que la photooxygénation impliquait un oxydant probablement gazeux. Il proposa qu'un PS excité déclenchait une excitation de l'O₂ pour former de l'O₂ activée. Mais son interprétation fut très controversée pendant 30 ans pour finalement être acceptée en 1964 (Foote, 1991).

De nos jours, nous savons que le procédé débute avec l'absorption d'un photon par le PS qui doit être capable d'emmagasiner l'énergie pendant un certain temps (micro- ou millisecondes). Ceci est possible lorsque l'électron excité change son axe de rotation, une situation transitoire dénommée croisée intersystémique. La molécule est alors excitée et peut soit retourner à son état par l'émission d'un photon de fluorescence ou bien continuer son excitation pour atteindre un état excité très réactif (triplet). Une fois l'état triplet généré, celui-ci peut effectuer un transfert d'énergie soit avec l'état fondamental de l'O₂ ou avec un substrat biologique. Les réactions photochimiques de type 1 impliquent l'abstraction d'un hydrogène ou des réactions de transfert électronique entre l'état triplet du PS et un substrat biologique, un solvant ou une autre molécule de PS présent dans le tissu, générant des radicaux libres et ioniques.

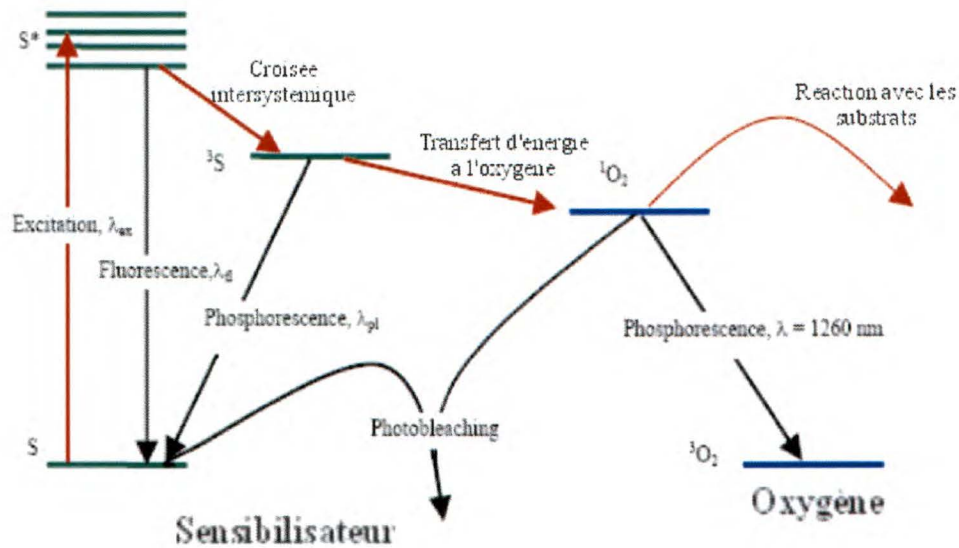


Figure I.1: Mécanismes d'excitation du PS (De Rosa et Crutchley, 2002; Sharman et al., 2000; Castano et al., 2004).

Ces radicaux peuvent alors réagir avec l' O_2 et former des radicaux hydroxyles, des peroxydes et l'anion superoxyde. Ces espèces hautement réactives produisent des dommages biologiques oxydatifs menant à la mort cellulaire (figure I.2). Un PS excité peut aussi servir d'intermédiaire et former de l' $^1\text{O}_2$. Dans ce deuxième mécanisme (type 2), le PS retourne à son état fondamental en transférant directement son énergie à une molécule d' O_2 qui est alors transformée sous une forme excitée (triplet), l' $^1\text{O}_2$. Cette forme hautement réactive de l' O_2 est produite par excitation électrique d'une molécule d' O_2 et peut réagir avec un grand nombre de substrats biologiques et induire des dommages oxydatifs provoquant la mort de la cellule.

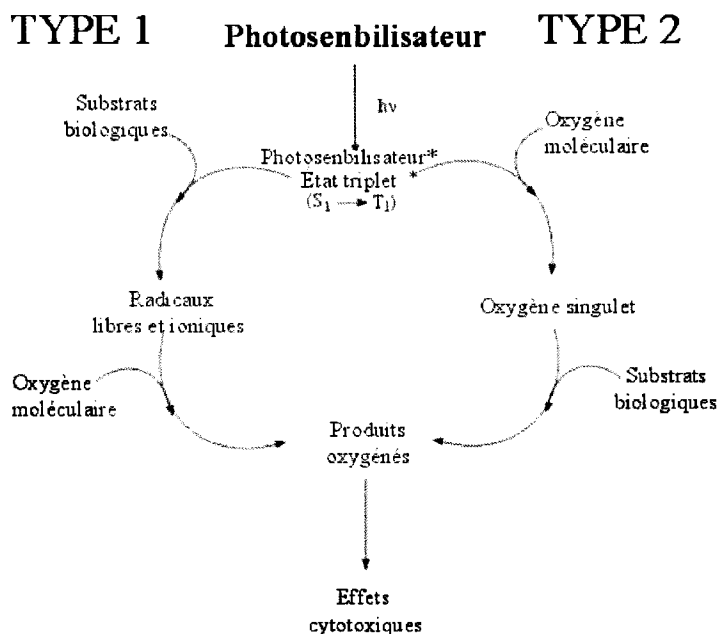


Figure I.2: Mécanismes d'action de la TPD (De Rosa et Crutchley, 2002; Sherman et al., 2000; Castano et al., 2004).

Puisque le PS n'est pas consommé dans ce procédé, une molécule de PS peut subir plusieurs excitations durant l'illumination et créer un nombre impressionnant de radicaux et d' $^1\text{O}_2$. Une fois l' $^1\text{O}_2$ créé, sa haute réactivité et sa courte demi-vie provoquent une réaction instantanée avec les cibles cellulaires dans son voisinage immédiat. La majorité de ces réactions est irréversible et mène à la consommation d' O_2 . Cette dernière est assez significative pour causer des diminutions mesurables dans l'oxygénation de tissu. En plus de ses réactions avec les cibles cellulaires, l' $^1\text{O}_2$ peut réagir avec le PS. Ceci mène à sa destruction irréversible et réduit son activité photodynamique. De plus, une petite fraction de l' $^1\text{O}_2$ peut être perdu via l'émission d'un photon de phosphorescence par un retour automatique à son état fondamental.

Même s'il est reconnu que la majorité des PS accomplissent leur effet photodynamique selon le mécanisme réactionnel de type 2, l'importance des réactions de type

1 amplifie la réduction de la concentration en O_2 dans les tissus. Comme les deux mécanismes impliquent une réaction en chaîne de radicaux en présence de l' O_2 aboutissant à des dommages oxydatifs similaires, l'effet photodynamique global dans une tumeur est une sommation des effets individuels des deux mécanismes impliqués.

I.4 Principaux facteurs influençant l'efficacité de la thérapie photodynamique

L'activité photodynamique est influencée à différents niveaux individuellement ou collectivement par ces trois principaux acteurs: la lumière, l' O_2 et le PS. Une thérapie efficace exige la présence de ces trois éléments essentiels dans toutes les régions ciblées et une seule déficience d'un de ces trois éléments empêche toute activité phototoxique. De plus, l'effet photodynamique global dans une masse tumorale est influencé par la croissance anarchique de la tumeur, l'hétérogénéité tumorale, l'activité métabolique des cellules tumorales, la présence d'anomalies génétiques ainsi que par les conditions de traitement telles que la température, le temps d'incubation avec la drogue, la dose de lumière, etc.

I.4.1 Lumière

Une excitation efficace du PS nécessite une source lumineuse générant une quantité suffisante de photons d'une longueur d'onde adaptée aux spectres d'absorption électronique du PS. *In vitro*, on utilise généralement une source lumineuse à spectre large muni de filtre afin de favoriser le passage des longueurs d'ondes correspondant au spectre d'absorption du PS. Dans ces conditions expérimentales, l'utilisation d'un film cellulaire très fin (μM), un apport constant en O_2 sans aucune restriction de la surface d'illumination permet de présumer que la phototoxicité dépend surtout du type de cel-

lules cancéreuses, de la dose de lumière administrée et bien sûr de la localisation intracellulaire du PS. Une augmentation du temps d'illumination se traduit par une augmentation de la mort cellulaire pour tous les types de cellules. Mais la dose requise pour détruire 90 % des cellules de lignées différentes est fortement influencée par leurs capacités réparatrices. Par exemple, pour des conditions expérimentales identiques de TPD, la lignée cellulaire tumorale EMT-6 est plus sensible à la TPD que les lignées cellulaires A549 ou bien J774 (Allen et al, 2001; Brasseur et al., 1999).

In vivo, la pénétration de la lumière est influencée par plusieurs autres facteurs dont sa longueur d'onde, le type et la pigmentation du tissu, la dimension et la localisation de la tumeur ainsi que les caractéristiques d'absorption du PS (Nowis et al., 2005). En premier lieu, l'intervalle d'activation de la lumière visible se situe entre 600 et 900 nm. Sous 600 nm, la forte capture des photons émis par l'hémoglobine limite fortement la pénétration de la lumière dans le tissu. Tandis qu'une lumière supérieure à 900 nm n'émet pas une énergie suffisante permettant la production de $^1\text{O}_2$ (Castano et al., 2004). La profondeur de pénétration de la lumière dépend également de sa longueur d'onde, une lumière de 800 nm pénètre 5 mm de plus que celle de 630 nm (Nowis et al., 2005; Castano et al., 2004; Allison et al., 2004a). L'utilisation d'un PS ayant une absorption maximale vers 800 nm permet de traiter des tumeurs plus grosses ou plus profondes. Une éradication d'une tumeur de plus de 1 cm est possible mais exige un apport important du système immunitaire (Moan et Peng, 2003).

En second lieu, la lumière doit être délivrée de manière à fournir une énergie suffisante et recouvrir entièrement la région traitée. La dosimétrie est particulière à chaque PS et doit tenir compte des pertes encourues par la présence de molécules biologiques photosensibles, la réduction due aux propriétés physiques des tissus, la concentration de PS accumulée ainsi que son coefficient d'extinction (Castano et al., 2004; Hen-

derson et Dougherty, 1992). La lumière perd une quantité importante de son intensité durant son trajet par réflexion, dispersion, transmission ou par absorption dans les différentes cellules du tissu. L'intensité lumineuse diminue exponentiellement avec la distance donc plus le tissu est épais ou profond plus la lumière sera atténuée. Chaque tissu est caractérisé par un facteur d'atténuation et le niveau de pénétration du flux lumineux diminue progressivement avec l'augmentation du coefficient d'atténuation. L'absorption et la dispersion optique diffèrent d'un tissu à l'autre. La pénétration dans le foie est fortement réduite par la teneur élevée en hémoglobine tandis que la structure réfractaire de la calotte crânienne empêche l'exposition des tissus du cerveau (Henderson et Dougherty, 1992).

D'un point de vue tumoral, le développement d'une tumeur implique une augmentation du niveau de couches cellulaires autour de vaisseaux nourriciers. Cette croissance étagée occasionne un éloignement progressif des cellules périphériques de ces vaisseaux et une réduction importante de leur degré d'alimentation. À l'inverse, la pénétration de la lumière est atténuée par l'épaisseur du tissu tumoral donc les cellules plus centrales pourraient ne pas recevoir une intensité lumineuse suffisante pour permettre une photosensibilisation efficace.

Finalement, le PS absorbe une quantité de lumière et limite ainsi sa pénétration. Le PS sert de filtre et sa capacité d'absorption dépend de son coefficient d'extinction molaire. Plus il absorbe fortement à la longueur d'onde du traitement plus il arrête sa propagation. En raison de ces limitations, il est vraiment important de bien adapter la dosimétrie selon le PS, le type de tumeurs et des tissus environnants. Une source lumineuse idéale doit recouvrir une zone tridimensionnelle, provoquer un effet létal au dessus de la région tumorale et minimiser les dommages dans les tissus sains. Plusieurs types de sources lumineuses peuvent être utilisés mais les lasers restent de loin

les plus efficaces en raison de leurs propriétés uniques (Vladmirov et al, 2004). Ceux-ci sont des sources de lumière cohérente produisant une lumière monochromatique dans laquelle les particules de lumière, ou photons, se déplacent tous dans la même direction. Il en résulte un faisceau très focalisé qui possède un flux énergétique très puissant par unité de surface. Ces propriétés permettent au laser de produire un faisceau puissant plus pénétrant et plus sélectif pour les tissus ciblés.

I.4.2 Oxygène

L'O₂ sert d'accepteur d'énergie provenant du PS excité. Ce dernier est indispensable au déclenchement de la réaction phototoxique. L'efficacité de la TPD est proportionnelle à la pression partielle de l'O₂ et est complètement abolie en son absence. *In vitro*, l'aération maintient une atmosphère riche en O₂ et n'influence pas significativement l'effet phototoxique. Mais l'importance de l'O₂ peut être démontrée en cultivant les lignées cellulaires sous atmosphère contrôlée. On peut créer artificiellement une gamme variée de conditions allant de l'anoxie, passant par l'hypoxie jusqu'à la sursaturation. Par exemple, un effet phototoxique complet a été rapporté pour la Photofrin II en présence de 5 % d'O₂ mais un abaissement à 1% cause une réduction d'efficacité de 50% tandis que le ClAlPcS montre un comportement similaire mais une perte d'activité de 50 % est observée à une pression en O₂ plus faible équivalant à 0,33% (Henderson et Dougherty, 1992).

In vivo, la dynamique est complètement différente et l'oxygénation des tissus joue un rôle déterminant. Plusieurs facteurs influencent la concentration en O₂ dans les tissus comme la vascularisation, les caractéristiques du tissu, l'hétérogénéité et le métabolisme cellulaire (Nowis et al, 2005). La pression partielle en O₂ (pO₂) diminue en fonction de l'éloignement du réseau capillaire et augmente avec le niveau de vasculari-

sation, i.e. le nombre de vaisseaux sanguins. La pO_2 dans les tissus humains est largement inférieure à celle de l'air que nous respirons. En effet, si la pO_2 est de 15% au niveau des alvéoles pulmonaires, elle n'est que de 4% dans le foie, de 3% au niveau de la moelle osseuse et peut descendre jusqu'à 0.025% au centre d'une tumeur (Ebbesen et al., 2000; Lewis et al., 1999). La concentration en O_2 varie en fonction de l'emplacement de la tumeur donc l'oxygénation d'une tumeur rénale est généralement plus faible qu'une tumeur pulmonaire. L'hypoxie tissulaire au sens strict se définit comme une concentration en O_2 inférieure aux valeurs physiologiques et qui ne permet pas de satisfaire aux besoins des tissus. En oncologie, l'hypoxie se situe à une pression partielle en O_2 inférieure à 0,5 % (Lewis et al., 1999).

Dans la majorité des tumeurs, les cellules entourant les vaisseaux nourriciers sont généralement viables et bien oxygénées. En contrepartie, une masse tumorale est caractérisée par une croissance accélérée engendrant une organisation vasculaire chaotique qui perturbe rapidement la microcirculation. Cette situation hostile n'empêche pas la prolifération mais entraîne une distribution non homogène des nutriments. Dans la masse tumorale, les cellules tumorales sont très hétérogènes en terme de prolifération ou de consommation de l' O_2 . Les tumeurs solides contiennent des régions hypoxiques qui constituent fréquemment 5-30% de la population totale de cellules viables (Shyam et al., 1999). L'activité métabolique des cellules et l'épaisseur du tissu tumoral cause une réduction du taux de diffusion de l' O_2 engendrant une diminution de la concentration de l' O_2 de la périphérie vers le centre de la tumeur et autour des zones métaboliquement actives.

La présence de microzones hypoxiques ou anoxiques peut être répartie dans toute la tumeur mais la zone nécrotique apparaît après un éloignement de $>70\mu m$ des vaisseaux nourriciers (Vaupel et Mayer, (2005). Dans une zone hypoxique, les cellules

subsistent dans un environnement hostile et leur survie dépend de leurs capacités d'adaptation.

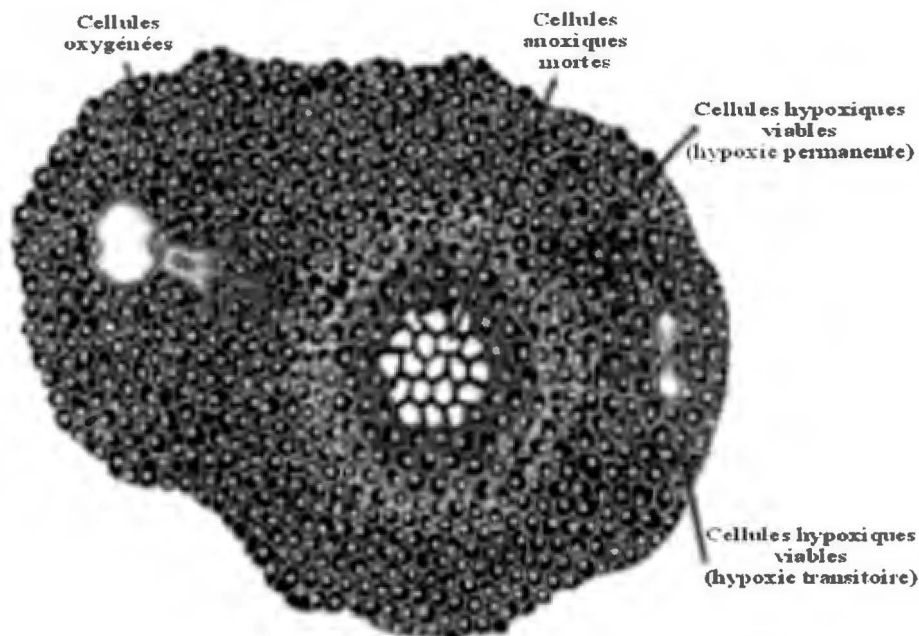


Figure I.3: Développement de zones hypoxiques permanentes et transitoires dans une tumeur (Shyam et al, 1999).

Généralement, ces cellules réduisent leur croissance jusqu'à la dormance provoquant une réduction de l'accumulation des drogues, une augmentation du temps disponible pour procéder aux réparations, une formation réduite de radicaux due à l'absence d'O₂, etc. Ces cellules restent viables et peuvent reprendre en tout temps leur vitesse normale de croissance permettant l'apparition de formes plus résistantes, plus agressives ainsi que des métastases. Durant la photosensibilisation, la fluctuation de la concentration en O₂ représente un autre point important limitant l'efficacité du procédé. Tout d'abord, le procédé consomme ou altère une quantité importante d'O₂. Par exemple, un taux de consommation, non négligeable, variant entre 6 et 9 $\mu\text{M}/\text{sec}$ a été rapporté en utilisant la Photofrin II et une source lumineuse de $50\text{mW}/\text{cm}^2$ (Fuchs et

Thiele, 1998). Le taux de consommation d'O₂ dépend des taux de photons délivrés et de triplets formés produits durant l'illumination. Généralement la vitesse de consommation dépasse le taux de réalimentation limitant la disponibilité de l'O₂ et générant de plus en plus des conditions hypoxiques.

En second lieu, la détérioration des vaisseaux durant l'illumination cause une réduction de l'oxygénation et conduit à l'hypoxie. Un effet cumulatif des deux phénomènes génère finalement une nécrose des tissus illuminés. Durant cette dernière étape l'alimentation en O₂ est interrompue par la constriction des vaisseaux et l'arrêt de la circulation sanguine. Le niveau d'O₂ est irréversiblement réduit provoquant des zones anoxiques et des dégâts irréversibles. Ces zones sont réputées pour protéger les cellules dormantes responsables de la recroissance tumorale après traitement.

Le fractionnement des doses d'illumination constitue une méthode permettant de maintenir une bonne oxygénation de la tumeur. Les périodes de noirceur permettent une réoxygénation des tissus hypoxiques et améliorent la destruction des cellules tumorales. Par contre, des périodes de 4-9 h peuvent aussi permettre à la cellule de réparer les dommages sous létax et augmenter la survie cellulaire ou la résistance des cellules au traitement. La réussite de cette méthode se situe surtout au niveau de la sélection du temps d'attente entre les périodes d'illumination et le temps optimal serait estimé à une heure.

1.4.3 Photosensibilisateur

Les PS sont des composés chimiques ou naturels capables d'absorber la lumière d'une longueur d'onde spécifique et la transférer à d'autres molécules pour produire des agents cytotoxiques létax. Une centaine de composés naturels ou synthétiques peuvent jouer le rôle de PS. À ce jour, il existe trois grandes générations de PS. La pre-

mière génération est représentée par des dérivés de l'hématoporphyrine comme la Photofrin®. Des inconvénients majeurs sont reliés à l'utilisation des porphyrines dont une accumulation importante dans les tissus cutanés provoquant une photosensibilité accrue de la peau à la lumière, une faible absorption dans la région de 630 nm, largement atténuée par l'hémoglobine contenue dans les globules rouge du sang ainsi qu'une présence significative d'impuretés. Pour pallier à de tels inconvénients, la recherche de nouveaux PS demeure un atout important. Un PS idéal pour la TPD devrait répondre aux exigences suivantes (Allison et al., 2004b; Sharman et al., 1999; Castano et al., 2004) :

- a) Être chimiquement pur
- b) Composition connue et stable
- c) Hydrosoluble
- d) Administration facile
- e) Avoir une toxicité minimale et ne générer aucun dérivé toxique dans le noir
- f) Activité phototoxique
- g) Non mutagène et non cancérogène
- h) Être préférentiellement retenu par les tumeurs
- i) Être rapidement excrété du corps sans induire de toxicité systémique
- j) Avoir une réactivité photochimique élevée, avec des rendements élevés d'états triplets (ϕT) avec de longues demies vies (τT)
- k) **Être capable de** produire une quantité suffisante d'espèces réactives de l' O_2
- l) Avoir une forte absorbance avec un coefficient d'extinction molaire (ϵ) élevé à une plus longue longueur d'onde (600-800 nm)
- m) Provoquer une photosensibilité minimale de la peau à lumière du soleil. (≤ 24 heures).
- n) PS optimal pourra être combiné à d'autres formes de traitement telles que la chirurgie, le rayonnement, et la chimiothérapie.

À ce jour aucun PS ne peut être considéré idéal pour chacune des applications possibles mais on peut toujours tirer les propriétés optimales de chaque sujet et développer des PS plus puissants. Ces PS, dit de seconde génération, regroupent plusieurs composés chimiquement plus purs comme les Pcs, les chlorines, l'acide 5-aminolévulinique (5-ALA), Foscan®, les porphyrines synthétiques, etc. Tous sont caractérisés directement par leur structure chimique. La plupart d'entre eux dérivent de la classe des tétrapyrroles de type porphyrine, des composés formés d'un noyau aromatique avec un large système conjugué d'électrons- p . De ces représentants, les Pcs sont considérés très prometteurs en raison de leurs propriétés chimiques améliorées et apparaissent comme une alternative aux porphyrines.

i Définition et propriétés des phtalocyanines

Les Pcs sont des colorants fortement utilisés comme pigment pour l'encre d'impression ou la peinture. De plus ces colorants ont la propriété d'être sélectivement retenus par les cellules cancéreuses ce qui leur confère une place en oncologie. Les Pcs sont des dérivés d'azoporphyrines dont le macrocycle est composé de quatre groupes pyrroles fusionnés par des liens azotes et étendu de quatre anneaux de benzène au niveau des sous unités pyrroles (figure I.4).

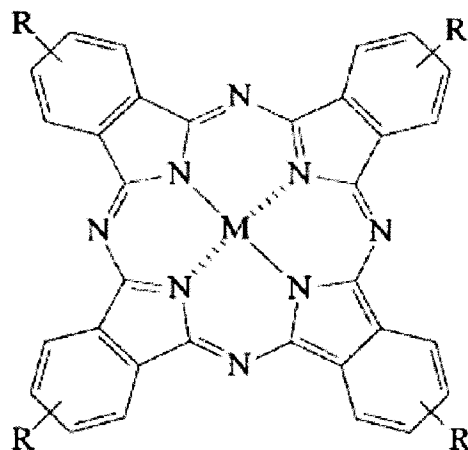


Figure I.4 : Structure typique d'un phthalocyanine où M est un ion métallique central (Al, Co, Ga, Si, Zn) et R représente une multitude de substituants périphériques dont SO_3H , F, COOH , etc.

Ces modifications structurales provoquent un déplacement de l'absorption à des longueurs d'ondes plus éloignées dans la région rouge du spectre d'une intensité plus forte que les bandes de Soret. Ce changement d'absorption permet une capacité de pénétration améliorée et un coefficient d'extinction molaire supérieur ($\epsilon \approx 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) augmentant leur phototoxicité comparée aux porphyrines (630 nm, $\epsilon \approx 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Les Pcs sont non toxiques, stables, faciles à synthétiser ou à modifier afin d'améliorer leurs propriétés photophysiques et pharmacologiques. De plus, l'utilisation de Pcs réduit significativement la photosensibilité de la peau des animaux traités (van Lier, 1990; Allen et al., 2001; Sharman et al., 1999).

ii Métal central

L'ion métallique central peut être représenté par Al, Co, Cu, Fe, Ga, Si ou Zn et chacun d'entre eux affecte différemment la stabilité, les rendements et les propriétés de

transfert d'énergie du triplet. Une photosensibilisation efficace exige un triplet possédant une demi-vie d'au moins une microseconde. L'incorporation d'un ion diamagnétique (Al, Ga, Si ou Zn) dans le centre du macrocycle peut donner des triplets d'une demi-vie ($\tau_T \geq 0,4$ ms) et une énergie variant entre 110 et 125 kJ/mole, laquelle est suffisante pour générer de l' 1O_2 (94,5 kJ/mole) (Allen et al, 2001). Ces MPcs donnent des rendements supérieurs à 0,5 en 1O_2 . Les composés sans métal central et ceux contenant des métaux paramagnétiques (Cu, Co et Fe) produisent des triplets de courte demi-vie ($\tau_T < 20$ ns) et affichent une phototoxicité minimale (van Lier, 1990). Nous avons sélectionné le Zn comme ion métallique central pour trois raisons : a) donne un état triplet de très longue demi-vie, b) très réactif pour la synthèse chimique des produits et c) aucune substitution axiale possible.

iii Modification structurale

Les Pcs sont généralement des composés hydrophobes et insolubles dans la plupart des solutions aqueuses. Une augmentation de la solubilité des Pcs faciliterait leur utilisation dans les systèmes biologiques. La structure chimique des Pcs se modifie facilement par l'ajout d'un ou de plusieurs substituants à partir des valences excédentaires du métal central ou des benzènes périphériques. Par contre, l'emploi du Zinc comme ion métallique limite les modifications structurales aux éléments périphériques du macrocycle parce qu'il est dépourvu de valence supplémentaire comme le Ga, Al et Si.

L'obtention d'un dérivé soluble du ZnPc peut être réalisée par sulfonation soit par condensation de l'acide sulfophtalique ou par réaction directe avec l'acide sulfurique fumant. Le produit final est typiquement un mélange de mono- di- tri- et tétrasulfoné ZnPc que l'on peut facilement séparer par chromatographie en phase liquide inversée.

La méthode directe donne des dérivés plus actifs. Les études précédentes de notre équipe portant sur les PcS hydrosolubles ont démontré leur efficacité pour la destruction des cellules tumorales *in vitro* et la régression de tumeurs *in vivo*. Les propriétés hydrophobes et hydrophiles dépendent du degré de sulfonation et affectent différemment le niveau d'agrégation, la capacité de produire de l' $^1\text{O}_2$ et l'activité photodynamique résultante (Wagner et al., 1987).

Nous avons précédemment synthétisé des ZnPcS de zinc, de gallium et d'aluminium avec divers degrés de sulfonation par des méthodes de condensation ou de sulfonation (Ali et al., 1988). Ces études précédentes ont établi une relation inverse entre la solubilité et l'activité en fonction du nombre de groupements sulfonates (SO_3^-). Plus le nombre de SO_3^- croît plus la solubilité augmente par contre la phototoxicité devient négligeable. Ces études ont aussi démontré que la présence de deux groupements SO_3^- adjacents (ZnPcS_{2a}) produit une activité photodynamique maximale mais la présence d'un grand nombre d'isomères (≈ 16) complique grandement la purification d'une seule forme isomérique.

Afin de préserver une solubilité et une activité maximale, notre stratégie est de synthétiser une nouvelle série de ZnPcS avec trois groupements SO_3^- périphériques et un autre groupement lipophile périphérique plus ou moins long modulant l'hydrophilie du ZnPcS₃ à un niveau correspondant à notre puissant ZnPcS₂. Puisque le macrocycle du ZnPcS₃ est hydrophobe et que les groupements sulfonates périphériques attachés sont hydrophiles, la modulation des propriétés amphiphiliques du ZnPcS peut être accomplie en substituant un groupement SO_3^- par une chaîne lipophile d'alkyles de différentes longueurs. L'utilisation d'un agent protecteur combinée avec l'action catalytique du palladium nous a permis de préparer une série originale de ZnPcS₃ substitué avec des chaînes de carbone de différentes longueurs sur le quatrième groupement

benzyle libre (Tian et al, 2000). Dans le premier article de cette thèse, nous comparerons les propriétés de ces nouveaux ZnPcS₃ pour établir la relation entre la structure et le potentiel photodynamique global.

I.5 Sélectivité et distribution

En conséquence, la localisation et la concentration intracellulaire du PS joue un rôle important sur le destin final de la cellule ciblée. L'ampleur des photodommages dépend principalement de l'état d'agrégation du PS (seulement les espèces monomériques sont photoactives), de sa localisation dans les cellules et de la dose de lumière (Gantchev et al., 1994 a et b). Par contre, la distribution biologique est influencée par l'hydrophobie (Allen et al., 2002; Sharman et al., 2000; Moor, 20002) et par la durée d'incubation de l'agent photosensible avant illumination.

I.5.1 Notion d'hydrophobie et d'incorporation cellulaire

L'effet phototoxique dépend grandement de la capacité des PS à traverser les différentes membranes de la cellule. L'hydrophobie détermine souvent la vitesse de diffusion des molécules à travers la membrane, l'interaction des molécules avec des protéines du sérum, aussi bien que leur distribution dans les emplacements spécifiques (organelles) de la cellule (Allen et al., 2001; Urizzi et al., 2001; Polo et al., 2002). L'importance de la lipophilie vs l'hydrophobie pour l'activité photodynamique du PS a été démontrée dans beaucoup d'études (Allen et al., 2002; Zeng et al., 2001; You et al., 2003). Des PS amphiphiles (Wagner et al., 1987) et hydrophobes avec moins que deux charges négatives peuvent être intériorisés dans les cellules par la diffusion passive, par endocytose via une association avec des lipoprotéines de faible densité (Paquette et

al., 1988; Kessel et al., 1987) ou grâce à l'albumine ou bien par une combinaison de ces procédés. Des PS hydrophiles ou des PS hydrophobes avec plus que deux charges négatives, ne peuvent pas diffuser à travers la membrane plasmique mais peuvent être transportés par endocytose en formant des liens non covalents avec les protéines du sérum telles que l'albumine et les globulines (Siboni et al., 2002).

De plus, les Pcs possèdent des propriétés hydrophiles et hydrophobes différentes selon leurs structures chimiques affectant leur tendance à s'agréger, changeant leur capacité de produire de l' $^1\text{O}_2$ et résultant en un large éventail d'effets photodynamiques (Wagner et al., 1987). Les PS hydrophobes tendent à s'agréger dans un milieu aqueux (Philips, 1997) diminuant leur activité photodynamique tandis que les PS hydrophiles s'incorporent plus difficilement dans la cellule (Kessel et al. 1987), ciblent des lieux moins photosensibles (Kongshaug et al. 1989) et sont plus rapidement éliminés *in vivo* (Woodburn et al, 1992). En général, les PS amphiphiles montrent une plus haute activité photodynamique (Allen et al., 2002; Brasseur et al., 1988).

Parmi les PcS, les composés substitués avec deux groupements SO_3^- adjacents possèdent une hydrophobie appropriée pour une pénétration optimale dans les membranes cytoplasmiques ce qui leur confère une haute activité photodynamique contre les cellules tumorales (*in vitro*) et les tumeurs animales expérimentales (Allen et al., 2002; Paquette, 1988; Magaron et al., 1996; Chan et al., 1996). Cependant de tels dérivés sont difficiles à purifier comme les produits isomères seuls. Pour combler cet inconvénient, nous avons précédemment synthétisé des ZnPcS, de gallium, et d'aluminium solubles dans l'eau avec divers degrés de sulfonation par condensation ou par sulfonation directe (Ali et al., 1988). Les résultats obtenus montraient qu'une augmentation du degré de sulfonation conduisait à une diminution de photocytotoxicité *in vitro* et *in vivo* et que cette diminution coïncidait avec l'hydrophobie des Pcs (Wagner et

al., 1987). Il a été aussi suggéré que la sélection tumorale et la rapidité de clairance dépendent aussi du degré d'hydrophobie des PS (Kessel et al, 1987; Kongshaug et al., 1989, Woodburn et al., 1992).

Nous avons démontré aussi que l'addition de groupements terbutyles sur GaSPc améliore les propriétés hydrophobes des drogues résultant à une augmentation de la photocytotoxicité (Brasseur et al., 1987). De son côté, Woehrle et ses collaborateurs ont aussi rapporté que l'introduction de différentes chaînes alkyles à une série de Pc chargé positivement déséquilibre le caractère hydrophile/lipophile du PS (Woehrle et al., 1990). De plus, les principales conclusions tirées de l'étude de Pandey, sur une série de purpurinimides contenant les différents substituants alkyles, sont que la lipophilie n'affecte pas les rendements en $^1\text{O}_2$ des composés monomérisés et que la position des groupements alkyles joue un rôle plus important sur l'efficacité du PS (Zeng et al., 2001).

L'approche préconisée pour cette recherche consiste à ajouter des groupements hydrophobes sur le quatrième anneau benzyle du Pc trisulfoné qui module l'hydrophobie de manière à favoriser l'incorporation cellulaire et la photocytotoxicité *in vitro* (Paquette et al., 1991; Kudrevich et al., 1997). La mesure du niveau d'hydrophobie peut s'effectuer par au moins de deux manières: en mesurant le coefficient de partage entre X et Y ou en déterminant le temps de rétention par HPLC avec une colonne C18. La première mesure la préférence du PS pour le solvant organique (n-octanol) tandis que la seconde détermine la force des interactions hydrophobes. Dans le premier article, la détermination de l'hydrophobie sera évaluée par ces deux techniques. Les résultats nous permettront de démontrer que notre approche provoque une augmentation réelle de l'hydrophobie et d'établir, si possible, une corrélation entre les deux méthodes de mesures.

I.5.2 Localisation intracellulaire des photosensibilisateurs

L'effet phototoxique dépend grandement de sa localisation intracellulaire. Les courtes demi-vies de l'état excité (≈ 200 ns) et de $^1\text{O}_2$ (40 ns) limitent les effets dynamiques de la TPD à la proximité immédiate du PS (≈ 20 nm). Les PS actuellement utilisés en TPD se localisent dans différentes structures et organelles de la cellule telles la membrane plasmique, les mitochondries, les lysosomes, l'appareil de Golgi et autres (Oleinick et al., 2002; Ali et Olivo, 2002; Kessel et Luo, 2001). Parmi les organelles intracellulaires, les mitochondries sont considérées comme une cible directe ou indirecte servant souvent comme point pivot pour l'induction de la mort cellulaire. Par contre, la TPD peut aussi induire une perte rapide de l'intégrité membranaire et de plus en plus la membrane plasmique est considérée comme un endroit déterminant pour l'induction du mécanisme de mort cellulaire. Il est donc d'intérêt de connaître la localisation du PS afin de déterminer les sites des dommages primaires et les voies de signalisation impliquées dans les réponses cellulaires (figure I.5).

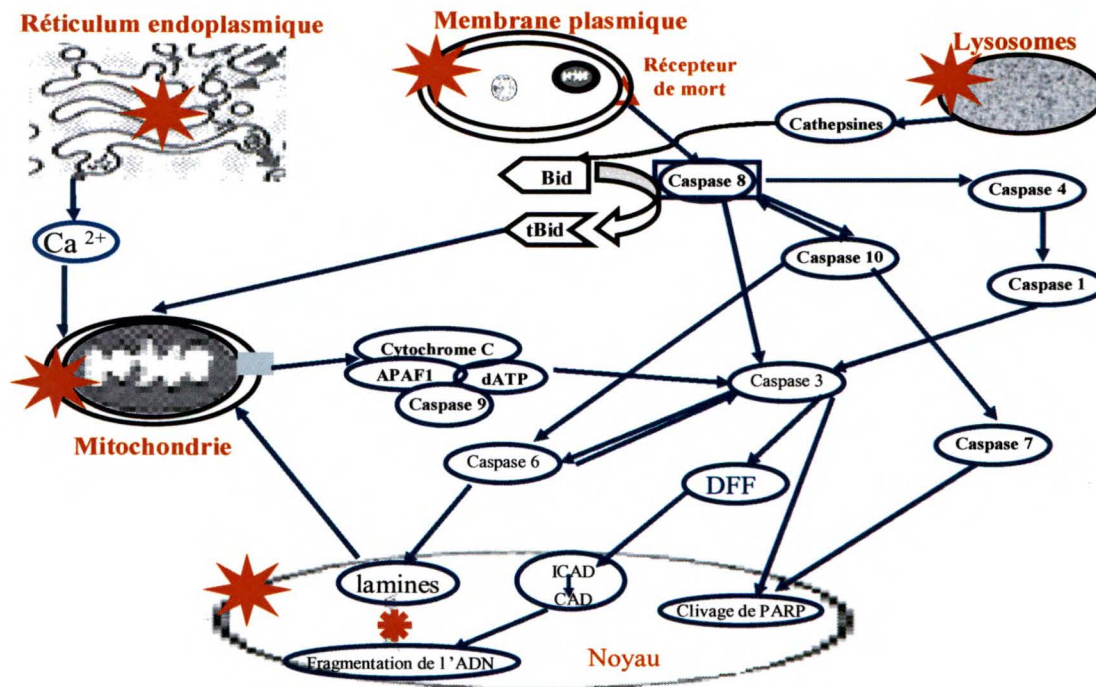


Figure I.5: Effet de la localisation intracellulaire des PS sur l'induction des voies apoptotiques par TPD (Oleinick et al., 2002).

I.5.3 Cibles, organelles et fonctions cellulaires

La capacité d'émettre de la fluorescence caractéristique est un atout puissant pour permettre de détecter la présence précise des PS dans la cellule. La microscopie fluorescente constitue une technologie détectant l'émission de fluorescence. En microscopie classique, le problème majeur est la présence d'un important bruit de fond lié à l'épaisseur de l'objet. Même si on réussit à faire un plan focal précis, l'enregistrement de l'information est entaché d'un bruit de fond qui se superpose à l'image observée. Ce bruit de fond résulte de l'excitation de tous les fluorochromes situés sur le trajet lumineux. L'utilisation d'un microscope confocal atténue fortement ce problème. Son principe consiste à focaliser, par l'intermédiaire d'un objectif, un faisceau laser qui va exciter les fluorochromes en un point de l'échantillon et par la suite récupérer le signal lu-

mineux émis en ce point par un photomultiplicateur. Tous les signaux provenant d'autres points de l'échantillon sont arrêtés par un diaphragme placé devant le photomultiplicateur. L'avantage de la microscopie confocale réside dans la faible profondeur de champs (0,5-1,5 μm) qui permet d'obtenir une image d'un plan focal (coupe optique). Il en résulte une très bonne sensibilité, une augmentation du contraste et une image de grande qualité. De plus, on peut obtenir des coupes optiques non seulement dans le plan X-Y mais aussi suivant un plan parallèle à l'axe optique (plan X-Z) permettant une reconstruction tridimensionnelle de l'objet. Ces coupes optiques n'affectent pas l'intégrité de l'échantillon biologique contrairement aux coupes physiques nécessaires en microscopie photonique ou électronique. En outre, l'acquisition numérisée des images permet d'accroître les possibilités d'analyse et de quantification.

Toutefois nous devons respecter certaines restrictions dont éviter tout chevauchement entre les différents produits fluorescents. L'acquisition séquentielle de deux canaux de fluorescence sur un ensemble de coupes optiques sériées permet de détecter la fréquence de coïncidences spatiales ainsi que les zones d'exclusion du marqueur et du PS. La superposition de deux ensembles de coupes ainsi que la construction de cytofluogrammes de visualisation pour chaque plan de coupe permet de repérer et d'estimer la co-localisation entre les deux produits fluorescents. La localisation intracellulaire des PS peut donc être réalisée grâce à l'utilisation de sondes fluorescentes spécifiques à l'organelle ciblée. Comme les Pcs émettent dans la région rouge du spectre, il est préférable d'utiliser des marqueurs émettant dans la région verte du spectre (vers 488 nm) et réserver la région rouge (> 590 nm) pour la détection de phtalocyanines. Le tableau I.3 regroupe les propriétés de toutes les sondes utilisées pour les expériences de localisation intracellulaire.

Tableau I.3 : Propriétés des sondes fluorescentes utilisées pour déterminer la localisation intracellulaire des PS

Nom de la sonde	Spécificité	Poids moléculaire MW	Excitation maximale (nm)	Coefficient d'extinction molaire ($M^{-1}cm^{-1}$)	Emission maximale (nm)
Mitotracker green FM	Mitochondrie	671.88	490	119 000	516
Lysotracker green	Lysosomes	398.69	504	80 000	511
NBD- C_6 -ceramide	Appareil de Golgi	575.75	466	22 500	535
Syto 13	Noyau (ADN)	~ 400.00	488	74 000	509
	Noyau (ARN)	~ 400.00	491	74 000	514
TMA-DPH	Membrane	461.62	355	75000	430

i Mitochondries

Les mitochondries sont des organelles pléomorphes présentes dans les cellules animales, où elles composent pas moins de 10% du volume cellulaire. Leurs structures varient selon le type de cellules, l'étape du cycle cellulaire et l'état métabolique intracellulaire. La fonction principale des mitochondries consiste à fabriquer l'énergie de la cellule en transformant le pyruvate en ATP par le cycle de Krebs par la phosphorylation oxydante et l'oxydation des lipides. Les mitochondries produisent l'essentiel de l'énergie (ATP) des cellules par oxydation des acides gras (cycle de Krebs) suivi par un transport d'électrons dans la chaîne respiratoire, processus bien plus efficace que celui de la glycolyse (plus primitif et n'utilisant pas l' O_2). De plus, elles ont aussi une fonction de concentration et de stockage des ions calcium, sodium et potassium où ils

sont stockés sous forme de granules opaques. La mitochondrie joue un rôle central dans l'induction de l'apoptose et constitue une cible de choix pour la TPD (figure I.5). Les dommages mitochondriaux induisent une mort cellulaire rapide découlant d'une dérégulation ou d'un dysfonctionnement du système respiratoire.

Les cellules tumorales possèdent généralement un nombre plus élevé de mitochondries. Les PS cationiques sont réputés pour s'accumuler préférentiellement dans les mitochondries en raison des propriétés électrochimiques de la membrane mitochondriale (Chen, 1988). La présence de la charge positive semble être un prérequis à cette sélectivité mais des caractéristiques additionnelles telles que le degré d'hydrophobie peuvent aussi jouer un rôle crucial. Quelques porphyrines et Pcs lipophiles cationiques ont aussi été visualisées dans la membrane mitochondriale des cellules *in vitro*. L'augmentation de l'hydrophobie du PS favorise ce type de localisation en formant des interactions hydrophobes avec des enzymes de la chaîne respiratoire (Kessel et al., 1997; Kessel et al., 2003). Cependant, les PS lipophiles ne sont pas aussi sélectifs parce que leur accumulation dans les mitochondries dépend fortement des phénomènes de division membranaire. En ce qui concerne les PS anioniques, leurs charges négatives ne favorisent pas leur accumulation dans les mitochondries, mais le degré d'hydrophobie peut moduler l'effet de la charge et permettre une certaine accumulation plutôt aléatoire dans cette organelle (Hasan et al., 2000).

Les sondes brevetées MitoTracker diffusent passivement à travers la membrane plasmique. À la différence du MitoTracker orange et du MitoTracker rouge, le MitoTracker green se concentre sélectivement dans les mitochondries actives indépendamment du potentiel membranaire mitochondrial, faisant de lui un bon outil pour marquer la masse mitochondriale. Contrairement aux sondes classiques telles que la rhodamine 123 et la tetramethylrosamine, le MitoTracker green est photostable, néces-

site de faibles concentrations (μM) et résiste à la perméabilisation. Cette dernière sonde possède l'avantage supplémentaire d'être essentiellement non fluorescente dans les solutés et fluorescente dans l'environnement lipidique mitochondrial. Par conséquent, le bruit de fond est négligeable ce qui permet une visualisation claire des mitochondries.

ii Lysosomes

Les lysosomes sont des sacs d'enzymes membranaires. Ce sont des réservoirs primaires de protéases non spécifiques et des vésicules excrétrices produites de l'appareil de Golgi. Leur rupture relargue des produits toxiques dans le cytoplasme comme des acides hydrolytiques. De façon très précise et ordonnée, les lysosomes décomposent des vieilles cellules ou des parties inutiles en petites molécules organiques réutilisables. Les lysosomes contiennent aussi d'autres enzymes importantes comme des glycosidases, phosphatases, élastase, cathepsines et carboxypeptidases. À première vue, les lysosomes sont un endroit de prédilection pour la destruction des éléments indésirables de la cellule. D'un autre point de vue, ceux-ci sont aussi des composantes tardives de l'endocytose et une destruction de ces organelles peut distribuer des molécules de PS incorporées dans le cytoplasme dans des endroits plus stratégiques ou bien à l'intérieur d'organelles occupant des fonctions plus vitales pour la cellule (Siboni et al., 2002).

Plusieurs données scientifiques démontrent que les PS anioniques s'accumulent préférentiellement dans les lysosomes, ce qui en fait des cibles potentielles pour la TPD. Ils peuvent être des sites primaires d'accumulation mais leur destruction durant l'illumination redistribuent les PS incorporés dans toutes les organelles cytoplasmiques

et plus spécifiquement dans le noyau (Kessel et al., 2000). La TPD peut aussi provoquer la rupture des lysosomes et libérer une ou plusieurs protéases impliquées dans l'activation de voies apoptotiques (Reiners et al., 2002). Pour ces raisons, nous devons considérer les lysosomes comme des sites possibles de localisation de nos Pcs en raison de leurs charges négatives. De plus, il a été rapporté que l'efficacité des PS accumulés dans les lysosomes dépend fortement de leur tendance à s'agréger ce qui sous-entend une importance de leurs propriétés hydrophiles et hydrophobes. Des variations d'hydrophobie pourraient favoriser une accumulation dans ce site et être un point déterminant dans l'étude de ce paramètre. Pour détecter la présence de PS dans les lysosomes, la sonde LysoTracker green paraît un choix intéressant pour marquer les lysosomes en raison de sa perméabilité aux membranes cellulaires et sa sélectivité élevée (optimale à des concentrations nanomolaires).

iii Appareil de Golgi et réticulum endoplasmique

L'appareil de Golgi est composé de petits sacs membraneux et est associé au réticulum endoplasmique. Bien que son rôle ne soit pas complètement élucidé, il semble être spécialisé dans le transport de macromolécules et dans la dégradation de produits qui sont transformés et emballés dans des sacs avant d'être dirigés vers leur destination finale. Un dommage à cette organelle perturbe la synthèse et le cheminement des protéines ainsi que l'excrétion des produits de dégradation ou bien des déchets cellulaires (Teiten et al., 2003).

La plupart des sondes pour l'appareil de Golgi sont perméables et de nature lipidique. La lipophilie de ces sondes permet une incorporation facile dans les cellules. Les plus efficaces pour l'appareil de Golgi sont les céramides et les sphingolipides

fluorescents. En outre, les analogues de la céramide produisent une coloration sélective du complexe de Golgi pour sa visualisation par microscopie fluorescente. Ces analogues fluorescents sont préparés à partir de la D-erythro-sphingosine. La sonde NBD C6-ceramide n'est peut-être pas idéale en raison d'une absorption molaire et d'un rendement énergétique résultant à une émission moins intense. Mais cette sonde émet dans la région verte du spectre et son incorporation cellulaire peut être facilement améliorée en utilisant des complexes lyophilisés de Ceramide-BSA (BSA l'albumine de boeuf) (Pagano et Martin, 1998).

iv Membrane plasmique

La membrane plasmique renferme le contenu de la cellule. Sa fonction principale est de contrôler ce qui s'introduit dans la cellule et ce qui en sort. La membrane plasmique constitue donc la porte d'entrée de la cellule. Les PS anioniques ont tendance à s'accumuler dans les structures membranaires. Les principaux effets de la TPD rapportés avec des PS liés à la membrane plasmique sont à faible dose une cessation de la prolifération cellulaire et à forte dose une perte d'intégrité de la membrane plasmique caractérisée par un gonflement de la cellule sans externalisation des Pser et sans fragmentation de l'ADN (Piette et al., 2003; Nishiyama et al., 2003).

En fait, les phospholipides sont les principaux constituants des membranes de cellules. La plupart des phospholipides sont des dérivés de glycérol comportant deux résidus d'acyles gras (queues non polaires) et un substituant simple d'ester de phosphate (groupe principal polaire). L'utilisation de sondes, ayant une ressemblance structurale aux lipides normaux, peut marquer efficacement les structures membranaires de la cellule. Comme les fluorophores inclus dans ces sondes tendent à rester emprison-

nés dans la partie hydrophobe des deux couches lipidiques de la membrane plasmique, ils marquent non seulement les structures membranaires mais deviennent sensibles aux propriétés de la membrane telles que la fluidité des lipides et la perturbation structurale par des protéines, des drogues et d'autres additifs. Trois analogues lipidiques fluorescents sont présentement disponibles: un produit neutre, le DPH (1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene) et deux dérivés cationiques le TMA-DPH (1-[4(triméthylamino)phényl]-6-phénylhexa-1,3,5-triene) et le TMAP-DPH (N-((4-(6-phényl-1,3,5-hexatrienyl)phényl)propyl) triméthylammonium p-toluenesulfonate). L'incorporation du groupement DPH comme fluorophore favorise une accumulation dans les structures membranaires. Le marqueur fluorescent cationique hydrophobe TMA-DPH semble plus apte pour les raisons suivantes à servir comme marqueur membranaire.

Brièvement, la charge positive du TMA-DPH empêche celui-ci de traverser la double couche lipidique de la membrane plasmique de cellules intactes en occasionnant son accumulation entre ses couches chargées négativement. La seule porte d'entrée de cette sonde s'effectue par invagination d'une partie de la membrane plasmique soit par endocytose ou pinocytose (Illinger et Kuhry, 1994). Le TMA-DPH n'est pas cytotoxique et résiste à la transformation métabolique. La fluorescence du TMA-DPH est négligeable dans un milieu aqueux; cependant lors de l'adhérence et de l'internalisation dans la membrane plasmique, ses propriétés photophysiques changent en raison de l'interaction avec un environnement lipidique, ayant pour résultat l'émission d'une intense fluorescence après photo-activation (rendement de quantum 0,7) (Coupin et al., 1999).

De plus, l'intensité de la réponse est proportionnelle à la surface disponible de membrane donc à la concentration cellulaire. Son intensité de fluorescence est donc sensible aux processus physiologiques qui causent un changement net de la superficie

membranaire, faisant du marqueur une excellente sonde pour observer des événements tels que des changements de volume cellulaire et des modifications de différentes structures membranaires durant l'exocytose et l'endocytose (Illinger et Kuhry, 1994; Coupin et al., 1999; Bronner et al., 1986). Particulièrement pendant son internalisation, TMA-DPH progresse de la périphérie de cellules aux régions périnucléaires avec peu de perte d'intensité de fluorescence. Le TMA-DPH peut être extrait facilement de la membrane périphérique par lavage et fournissant ainsi une méthode pour évaluer la fraction internalisée dans les cellules et les différentes étapes du mécanisme d'endocytose (Coupin et al., 1999). Finalement la membrane plasmique est imperméable TMA-DPH, ce qui lui confère l'avantage de ne pas être présent librement dans le cytoplasme des cellules. Sa cinétique d'internalisation est fortement influencée par l'intégrité et la rigidité membranaire. Cette sonde pourrait permettre de détecter non seulement les modifications structurales mais aussi d'évaluer la fluidité et l'intégrité de la membrane plasmique (Sharma M et al., 1997; Reid et O'Neil RG, 2000; Jessel et al., 2002; Kitagawa et al., 1998; Bronner et Landry, 1991).

v Noyau

En général, le noyau contient le matériel génétique de la cellule et on le considère comme le centre de commandement des activités cellulaires. Les PS atteignent rarement le noyau de la cellule et la production de photodommages à l'ADN ainsi que le potentiel d'induction de mutations ou de carcinogenèse sont des événements rares (Korbelik et Cecic, 2003). Présentement, l'internalisation photochimique (PCI) constitue la seule méthode étudiée pour permettre aux PS d'atteindre la membrane nucléaire (Hogset et al., 2004). Le PS est alors incorporé dans les membranes lysosomales et la rupture des lysosomes durant l'illumination provoque une libération des PS dans le

cytoplasme. Les PS libres peuvent interagir avec la membrane nucléaire et pénétrer dans le noyau pour induire des dommages plus ou sévères aux acides nucléiques.

Un nombre impressionnant de sondes fluorescentes commerciales permet le marquage spécifique du noyau. Dans notre cas, nous désirons utiliser une sonde soluble en milieu aqueux, diffusant librement à travers la membrane plasmique, détectant les acides nucléiques (ADN et ARN), excitable avec une source lumineuse de 488 nm et une émission entre 480 et 520 nm. Ces restrictions éliminent de nombreux colorants usuels tels que l'acridine orange, l'iodure de propidium, 6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) et le 2,5'-Bi-1H-benzimidazole, 2'-(4-ethoxyphenyl)-5-(4-methyl-1-piperazinyl) ou Hoechst 33342, trihydrochloride, trihydrate. En examinant la liste de tous les colorants disponibles, les propriétés du colorant SYTO 13 ont attiré notre attention. Ce colorant est largement utilisé pour la coloration des noyaux (Poot et al., 1997) et pour la détection de l'apoptose en combinaison avec des colorants non perméables comme l'iodure de propidium ou Hoechst (van Zandvoort et al., 2002).

1.6 Mécanismes de mort cellulaire induits par la TPD

L'ultime but de la TPD est la destruction des cellules indésirables. L'induction de la mort cellulaire par TPD est complexe et dépend de plusieurs facteurs isolés ou combinés dont le type de PS, sa concentration, le temps d'incubation avec les cellules tumorales, la dose de lumière, le type de cellules tumorales, etc (Plaetzer et al., 2005). De plus, la TPD stimule une variété de facteurs de transcription; a) ceux réagissant au stress oxydatif, b) ceux participant à l'activation des mécanismes de réparation et c) ceux qui déterminent le mécanisme de mort de la cellule condamnée (Oleinick et al., 2002). Deux types de mécanismes de mort cellulaire ont été décrits dans la littérature.

Le premier dépend de l'activité des protéases à cystéine, nommées caspases qui déclenchent une série d'événements génétiquement programmés nommée apoptose (Castano et al., 2005; Ramiro et al., 2004; Plaetzer et al., 2003). Le second mécanisme procède par des voies n'impliquant pas l'intervention de caspases comme la nécrose (oncose), l'autophagie, la paraptose ou bien par mort mitotique (Bröker et al., 2005). On parle très peu de mort mitotique en TPD puisque les PS ne s'accumulent que très rarement dans les noyaux pour induire directement des dommages génomiques. La plupart des mécanismes du second type sont mis en évidence dans des protocoles expérimentaux utilisant des inhibiteurs des voies apoptotiques ou bien avec des cellules défaillantes au niveau de certaines voies apoptotiques mais, à ce jour, aucune évidence de leur présence n'a été rapportée en ce qui concerne la TPD.

Les chercheurs chevronnés dans le domaine de la TPD acceptent que la majorité des cellules meurent soit par apoptose ou par nécrose passive. Mais de plus en plus les preuves s'accumulent démontrant des cellules possédant des traits caractéristiques des deux modes dans la même population cellulaire (Fabris et al., 2001). L'induction du mécanisme de mort cellulaire est plus complexe et dépend fortement de l'intensité des dommages. On peut facilement représenter la sévérité des dommages induits par un spectre débutant par une quantité de dommages non létaux (réparables) et la survie cellulaire, une augmentation graduelle du nombre de dommages létaux représentant un niveau intermédiaire, l'apoptose et finalement une sévérité accrue induisant une mortalité rapide de type nécrotique (Plaetzer et al., 2005). Mais en réalité, la situation est bien plus complexe. Le mécanisme d'action de la TPD est facilement modifié par les conditions d'incubation et/ou d'illumination (Piette et al., 2003; Fabris et al., 2001; Dellinger, 1996). Certaines études proposent l'existence d'une corrélation entre le site primaire de photodamage et la prévalence de la mort apoptotique ou nécrotique, mais

les facteurs responsables de ce choix sont pauvrement définis et nécessitent de futures investigations.

I.6.1 Mécanismes de la nécrose passive et de l'apoptose

i Nécrose

La nécrose est un mécanisme de mort passif, aléatoire, non énergétique, débutant par l'augmentation du volume du cytoplasme, une destruction des organelles, une dérégulation des fonctions de la membrane plasmique, la rupture de la membrane plasmique et le déversement dans le milieu du contenu cellulaire induisant une réponse inflammatoire. L'ADN nucléaire va aussi être dégradé de manière "aléatoire" (Bicknell et Coher, 1995; Dong et al., 1997) par des endonucléases activées notamment par des sérines protéases (Dong et al., 1997). Une fois mis en route, ce procédé est irréversible. Même aujourd'hui, plusieurs croient que la nécrose constitue une forme passive de la mort cellulaire avec plus de similitudes à un accident de train qu'un suicide donc nécessite l'induction de dommages sévères. Des informations récentes soupçonnent l'existence d'une nécrose programmée (Prokuyakov et al., 2003). Les protéases seraient les principaux acteurs enzymatiques de ce procédé mais leur identification, la spécificité de leur action et leurs substrats restent encore inconnus.

ii Apoptose

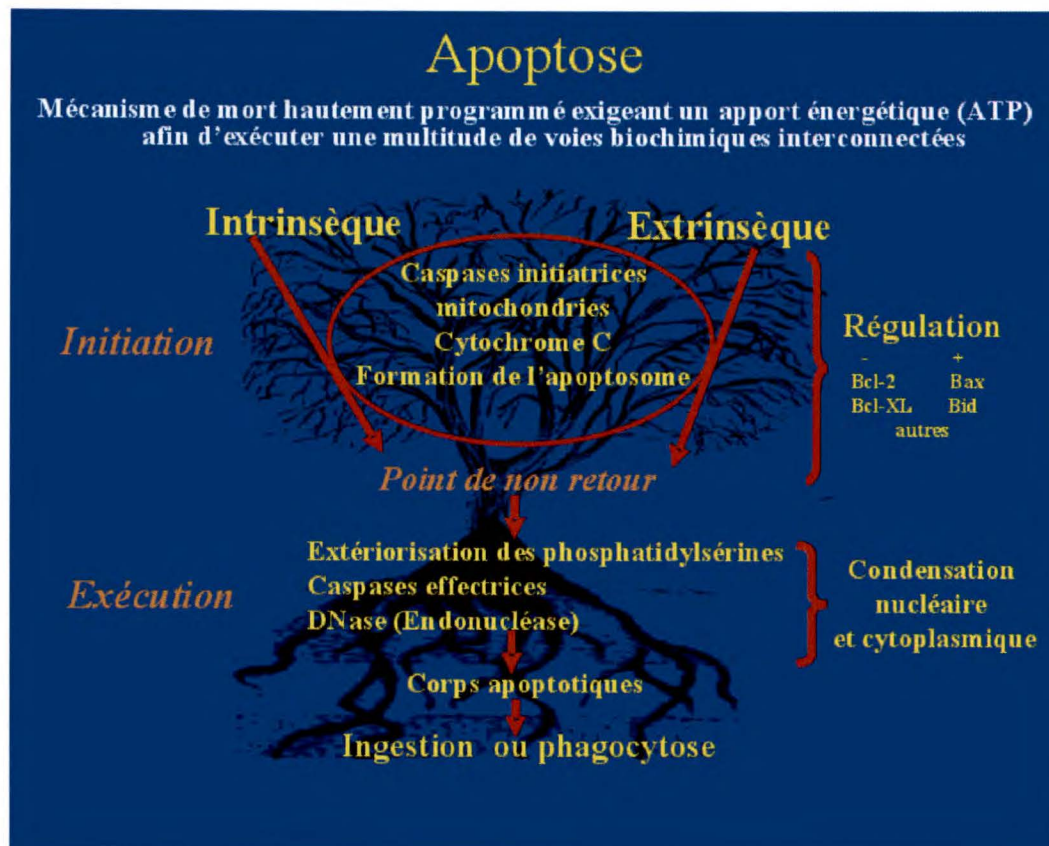


Figure I.6 : Les voies apoptotiques de la mort cellulaire programmée (Berry et al., 2001).

L'apoptose est caractérisée par une programmation rigide, dirigée par l'activation de la machine destructrice et un apport essentiel d'énergie sous forme d'ATP. La figure I.6 illustre la complexité des voies métaboliques de l'apoptose (Berry et al., 2001) où l'on peut discerner trois phases distinctes; l'initiation, un point de non retour et l'exécution. Comme dans un arbre, les ramifications des branches peuvent nous illustrer les nombreuses avenues possibles pour induire une mort apoptotique. Un arbre survit facilement à la perte de ses branches qu'il peut régénérer en créant de nouvelles pousses. Durant l'initiation, l'apoptose est hautement régulée et réversible. Mais des dommages aux racines sont plus drastiques pour la survie de l'arbre. C'est de même pour la cellule, quand elle franchit le point de non retour et débute son exécution, le

procédé devient irréversible. Ces phases impliquent principalement l'action d'une famille de protéines intracellulaires nommées "caspases" (protéases à cystéines), qui conduit au clivage de divers substrats protéiques essentiels à la survie cellulaire. De plus l'action de certaines caspases (principalement les initiatrices) provoque une stimulation d'une cascade de réactions biochimiques permettant une amplification du signal de mort.

Les PS induisent un stress oxydatif par la production d'espèces réactives de l'O₂. Ce stress provoque d'abord une induction des facteurs pro- et anti-apoptotiques. Le rapport entre ces stimuli et le potentiel d'oxydoréduction de la cellule dirige celle-ci vers la survie ou la mort. Si les cellules possèdent assez d'énergie, l'apoptose sera initiée par l'une de ces deux voies. La voie extrinsèque (figure I.7) est initiée par l'activation d'un récepteur de mort avec son ligand (FAS, TNRF, CD95L ou TRAIL), entraînant l'agrégation du récepteur à la surface de la membrane cellulaire et la formation d'un complexe multi protéique intracellulaire appelé DISC, qui transmet le signal à l'intérieur de la cellule. Ce complexe recrute à son tour la procaspases-8 par des interactions homologues et provoque son activation. La caspase-8 activée initie l'activation des caspases effectrices ou clive Bid (un homologue de Bcl-2) en TBid qui à son tour provoque l'apoptose par la voie mitochondriale.

La voie intrinsèque (figure I.7) est déclenchée par un dysfonctionnement de la membrane mitochondriale, qui cause le relâchement du cytochrome C dans le cytosol. Le cytochrome C se lie ensuite à Apaf-1 et provoque son oligomérisation en présence d'ATP. Ce complexe, nommé apoptosome, recrute et active une caspase initiatrice (caspase 9) (Oleinick et al., 2002; Castano et al., 2005; Ramiro et al., 2004). Comme la mitochondrie joue un rôle centralisateur, l'endommagement des lysosomes ou de l'appareil de Golgi peut aussi altérer la membrane mitochondriale, soit par une activation

de Bid en tBid par la libération de cathepsines présentes dans les lysosomes ou directement en répondant à un changement de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire par un photodommage du réticulum endoplasmique.

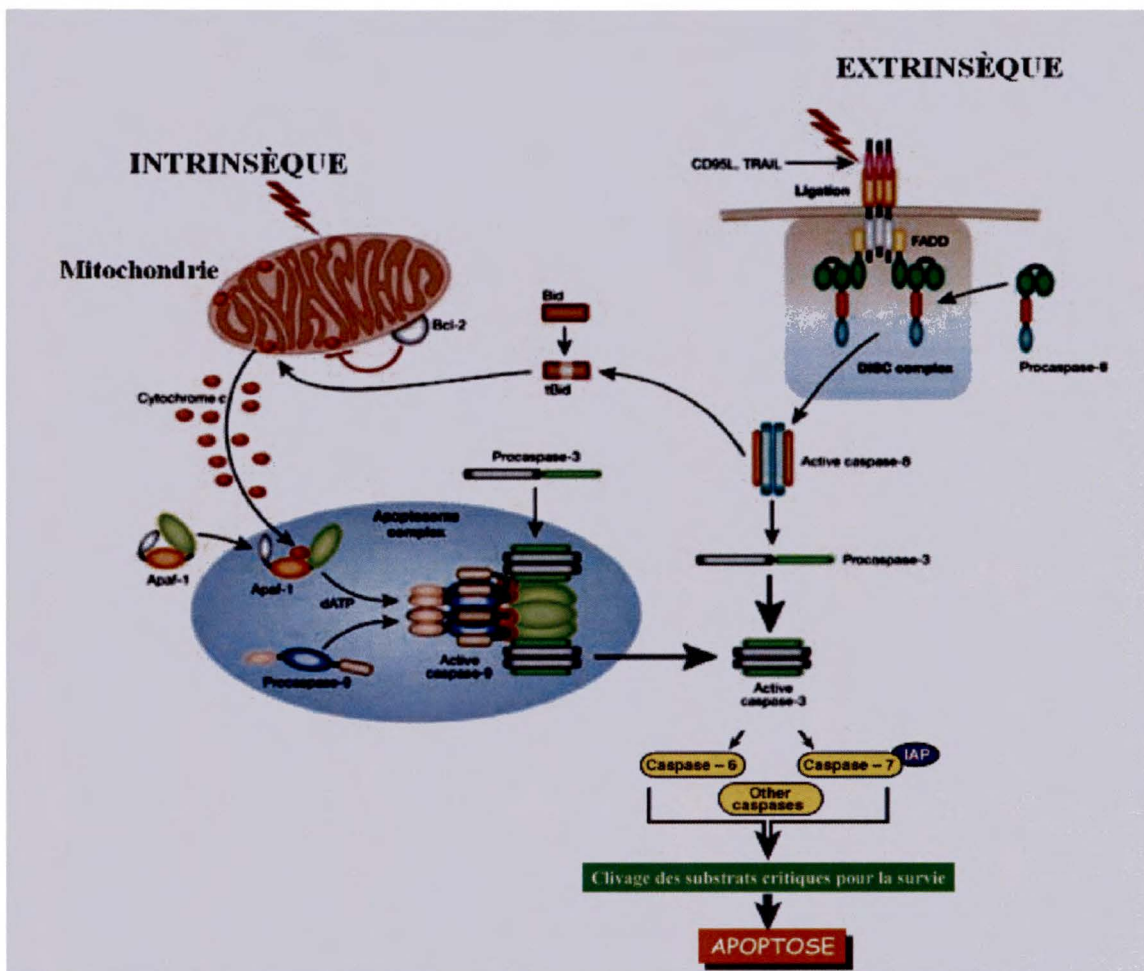


Figure I.7: Schéma des voies apoptotiques: intrinsèque et extrinsèque (Ramiro et al, 2004; Reed, 2003).

Après activation des caspases initiatrices (caspase 8 ou caspase 9), les deux chemins mènent à un point de non retour. Le début de la phase exécutoire coïncide avec l'externalisation des Pser et conduit à l'activation de la phase exécutoire caractérisée par l'activation des caspases effectrices 3, 6 et 7 (figures I.6 et I.7). Durant la phase execu-

trice, les cellules subissent plusieurs transformations dont une réduction importante de leur volume, une condensation de la chromatine, une dégradation spécifique de l'ADN aux sites internucléosomals engendrant des fragments multiples de 180–200 paires de base et une fragmentation du contenu cellulaire en corps apoptotiques. Ces corps apoptotiques renferment des organelles intactes et l'ADN est digéré. Les cellules et les corps apoptotiques sont finalement engloutis ou éliminés par phagocytose (Berry et al., 2001) grâce à la présence de Pser à la surface des cellules condamnées servant comme signaux d'élimination pour les macrophages qui exprime le récepteur de Pser. La synthèse d'un marqueur spécifique aux Pser externalisées permet de cibler les cellules apoptotiques au moment où le processus apoptotique devient irréversible.

1.6.2 Détection de l'apoptose ou de la nécrose

i In vitro

Les méthodes de détection de l'apoptose sont nombreuses, accessibles et reconnues. Toutes ces méthodes sont basées sur les différences au niveau des propriétés morphologiques, biochimiques ou énergétiques. Plusieurs marqueurs de l'apoptose peuvent démontrer son induction par la TPD avec les Pcs tels que l'activation des caspases, la fragmentation d'ADN, la condensation de la chromatine, la translocalisation des Pser membranaires, le clivage des protéines de l'enveloppe nucléaire, la modification du potentiel de la membrane mitochondriale, le relâchement du cytochrome C, etc. (Plaetzer et al., 2005). La mort apoptotique est confirmée généralement par la détection de plusieurs traits caractéristiques, c.à.d. par exemple, a) un aspect morphologique tel que l'externalisation des Pser ou la formation de corps apoptiques, b) des caractéristiques biochimiques comme la détection d'une échelle nucléosomale, le relâ-

chement du cytochrome C dans le cytoplasme ou bien l'activation des caspases et c) des paramètres énergétiques dont la conservation du niveau d'ATP intracellulaire, le maintien de l'intégrité de la membrane plasmique ou une perte graduelle du potentiel de la membrane mitochondriale.

Au contraire, la nécrose est souvent détectée par une fragmentation aléatoire de l'ADN, une perte de l'intégrité des organelles et de la membrane plasmique, la présence de protéines cytoplasmiques dans le milieu extracellulaire, une absence de l'activité enzymatique des caspases ainsi qu'une perte rapide et complète de l'ATP intracellulaire.

ii In vivo

In vivo, une tumeur se développe à partir des tissus d'un hôte et prolifère comme une entité indépendante interagissant avec son hôte. La situation se complique et on doit tenir compte de nouveaux paramètres de développement et d'alliance. Ceux-ci dérivent des caractéristiques tumorales telles que l'organisation structurale, l'hétérogénéité cellulaire, la présence de tissu conjonctif et la vascularisation (Nowis et al., 2005; Korbelik et Cecic, 2003). D'autres touchent surtout la réactivité immunitaire de l'hôte. Chez l'animal ou l'humain, la destruction tumorale inclut la mort de toutes les composantes tumorales et non seulement les cellules tumorales. Un traitement contre le cancer induit une réponse tumorale incluant une mortalité cellulaire et vise une régression tumorale. La TPD induit une réponse anti-tumorale impliquant deux voies primaires et une voie secondaire. Une représentation schématique de la régression tumorale induite par TPD est illustrée à la figure I.8 (van Duijnhoven et al., 2003).

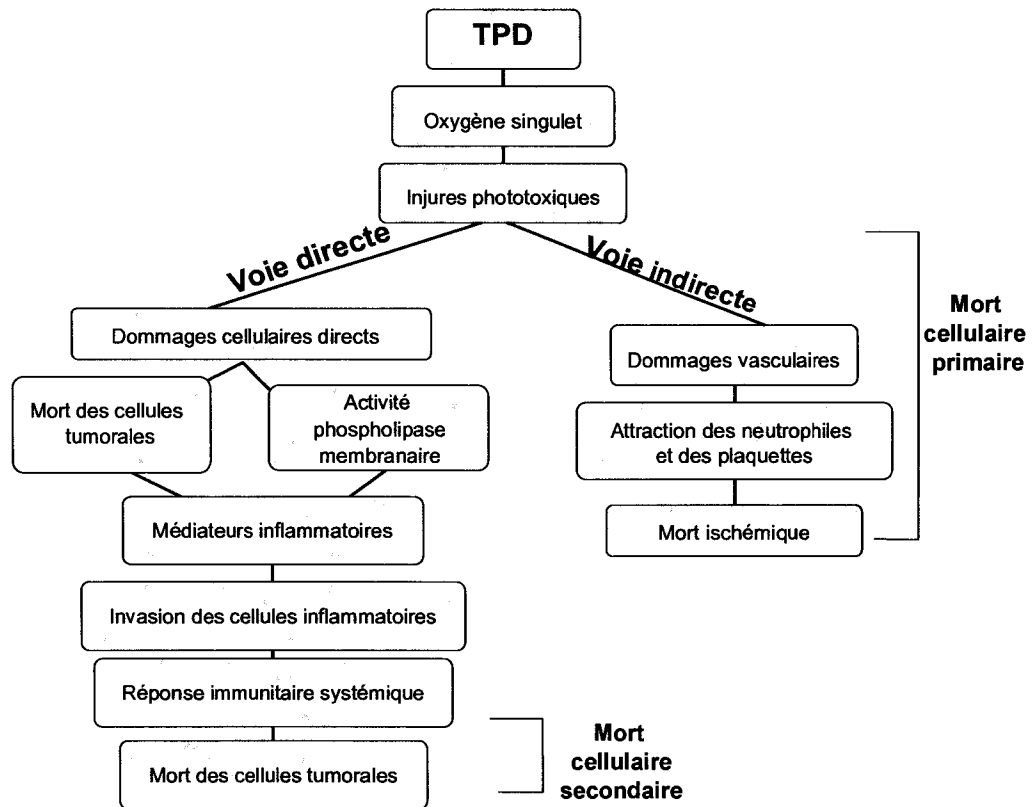


Figure I.8 : Schéma représentant la régression tumorale in vivo (van Duijnhoven et al., 2003).

La première voie détruit directement les cellules tumorales impliquant principalement l'apoptose. La destruction tumorale est provoquée par la production de radicaux libres et d' $^1\text{O}_2$ qui sont cytotoxiques (Sharman et al., 2000; Korbélik et Cecic, 2003) entraînant une destruction du tissu visé, en particulier au niveau des mitochondries, des lysosomes et de la paroi cellulaire. La deuxième, voie commune pour la plupart des PS, procède par la détérioration des cellules endothéliales du système vasculaire de la tumeur induisant une cascade de réactions biochimiques (Nowis et al., 2005; Korbélik et Cecic, 2003; Castano et al., 2005b; Krammer, 2001), possiblement liée à l'activation de plaquettes et le dégagement de la thromboxane (Korbélik et Cecic, 2003; Plaetzer et

al. 2003). La TPD peut également empêcher la production ou la libération de l'oxyde nitrique par l'endothélium, menant à une constriction plus importante des vaisseaux (Korbelik et Cecic, 2003; Gilissen et al., 1993). Ces événements vasculaires mènent à l'occlusion vasculaire et la mort ischémique des cellules restantes de la tumeur. Une régression tumorale complète nécessite une contribution des deux voies. Plusieurs preuves scientifiques démontrent l'implication d'une voie secondaire dominée par l'activation d'une réponse immunitaire non spécifique locale ou disséminée découlant des dommages induits par la photosensibilisation (Korbelik et Cecic, 2003; Korbelik et Cecic, 2002; Sun et al., 2002).

Brièvement, les injures phototoxiques induisent une destruction directe des éléments de la tumeur et des dommages membranaires ou vasculaires. Ce type de réponse primaire peut déclencher une mort secondaire dominée par le système immunitaire de l'hôte souvent aperçu par la formation d'œdème plus ou moins important près de la région illuminée. Les dommages primaires induisent plusieurs formes de stress oxydatif qui provoquent à leur tour une réponse adaptative complexe. Cette réponse secondaire provoque l'activation de plusieurs signaux cellulaires responsables de la régulation des protéines du stress et de la transcription d'une multitude de gènes de l'inflammation (Nowis et al., 2005 a et b). Par la suite, une libération de nombreux médiateurs inflammatoires stimule les mécanismes de défense. La phase systémique fait appel à ces médiateurs qui sont synthétisés localement ou qui sont à l'état de précurseur inactif dans la circulation. La présence des différents intermédiaires de la réponse systémique a été confirmée dans plusieurs modèles tumoraux.

Chez l'animal, plusieurs études démontrant l'efficacité des PS soulèvent des réactions immunes systémiques résultant du traitement photodynamique d'une tumeur

locale dont une régression de métastase à un emplacement éloigné des sites de traitement (Chen et al., 1999) ou bien une réduction immédiate du débit sanguin suivi d'un retour au niveau normal après un certain délai de la fin de l'illumination (Bérard et al., in press 2006). Plusieurs chercheurs rapportent le développement d'une mémoire immunologique de l'animal après traitement pouvant empêcher une recroissance des cellules tumorales détruites. Cette réponse antitumorale serait transférable et dépendrait principalement des lymphocytes de type T (Korbelik et al., 1996). L'engagement du système immunitaire et des mécanismes de défense contribuent favorablement à la régression tumorale. Néanmoins un effet nocif dangereux a été rapporté dans plusieurs études cliniques. Les lymphocytes de types T peuvent aussi accumuler une certaine proportion du PS. Durant l'illumination, ces lymphocytes peuvent être détruits ou inactivés par injures phototoxiques. Cet effet provoque une augmentation de l'expression des cytokines responsables de la suppression de l'immunité cellulaire ou une hypersensitivité de l'hôte (van Duijnhoven et al., 2003).

I.6.3 Effets additionnels influençant la réponse tumorale

En plus de tous les facteurs énumérés dans la section I.4, nous devons tenir compte de la réaction de l'hôte et de la présence d'une entité hétérogène proliférant plus ou moins indépendamment de son hôte. La croissance de la tumeur aboutit à la formation d'un tissu conjonctif associé aux cellules tumorales, qui s'appelle le stroma. Ce dernier est composé du système vasculaire et fait partie intégrante de la tumeur. Son rôle est de subvenir aux besoins nutritifs de la tumeur mais il peut aussi contribuer à l'accumulation du PS (Nowis et al., 2005). En général, la distribution du PS à l'intérieur des composants tumoraux dépend fortement de son hydrophobie. Un effet complémentaire peut être induit par une accumulation sélective des produits hydrophiles

ou amphiphiles dans le stroma. De plus, la lumière visible n'est pas un rayonnement ionisant et peut être utilisée à maintes reprises. Le fractionnement de la lumière diminue le degré de sévérité des dommages cellulaires, répartit ceux-ci sur une période de temps et réduit le taux de survie en appliquant plusieurs traitements successifs sans complications cumulatives, puisque la plupart des PS ne s'accumulent pas dans le noyau et n'apparaissent pas cibler directement l'ADN.

La communication intercellulaire (effet de voisinage) peut amplifier l'effet de la TPD sur les cellules avoisinantes et se définit comme un signal de détresse émis par des cellules endommagées à leurs voisines, par contact direct ou par des molécules sécrétées dans le milieu (Dąbrowska et al., 2005). Plusieurs travaux subséquents confirment l'implication de la coopération intercellulaire dans le procédé de photosensibilisation mais suggèrent fortement que l'effet du voisinage s'effectue par un transfert d'information à travers les jonctions intercellulaires de communication (gap) pendant ou peu après l'illumination. Ce transfert pourrait bien impliquer la libération dans le milieu d'espèces réactives de l'O₂ ou d'enzymes lysosomales et induire une mortalité supplémentaire des cellules avoisinantes. Une mort nécrotique devrait accroître la probabilité d'initiation de cet effet lors de la lyse cellulaire (Christensen et Moan, 1980).

I.6.4 Méthodes de détection de l'apoptose

En raison de la nature relativement propre du processus apoptotique, un facteur important du succès de l'agent de la TPD dépend de sa capacité à induire l'apoptose des cellules tumorales. Ce mode de mort conduit directement à une mort cellulaire réduisant ainsi les risques de sélection d'une souche plus agressive ou plus résistante qui, souvent, provoque l'inefficacité du traitement. Plusieurs nouvelles techniques

d'imagerie émergent pour la détection de l'apoptose, *in vivo*, dont l'utilisation de dérivés radioactifs ou d'anticorps monoclonaux de l'AnxV, d'inhibiteurs ou de substrats des caspases, la bioluminescence optique, l'ultrason et la spectroscopie de résonance magnétique (MRS/MRI). La spectroscopie de résonance magnétique (MRS/MRI) est limitée par la sensibilité relativement basse et la résolution spatiale faible (Korbelik et al., 1996). Les techniques d'imagerie, par émission de photons ou de positrons, se basent sur l'utilisation d'un dérivé radioactif de l'AnxV et exploite un événement hâtif de l'apoptose (Lahorte et al., 2004; Boersma et al., 2005).

Cet événement morphologique typique de la cellule apoptotique implique une modification de la structure de la membrane plasmique qui persiste jusqu'à la dégradation finale de la cellule. Pendant l'apoptose, un procédé enzymatique contrôle l'externalisation des Pser. L'induction de l'apoptose provoque une inhibition des enzymes responsables du maintien de la structure normale, la translocase et la floppase. Par la suite, la scramblase est activée et on assiste à la redistribution d'un composé présent au centre de la bicouche lipidique, la Pser, au feuillet externe de la membrane plasmique (Emoto et al., 1997). Cette extériorisation, considérée comme une étape importante dans l'initiation du processus apoptotique, est facilement détectée par une protéine, l'AnxV. Cette protéine, ayant une masse moléculaire de 36 kDa, possède une affinité élevée pour les molécules externes ou accessibles de Pser (Wood et al., 1996; Hofstra et al., 2001; Blankenberg et al., 2000; Subbarayan et al., 2003; Jendraszak et al., 2002; Kahn et al., 2001; Ran et al., 2002; Okamoto et al., 2002). Cette technique est fortement sélective et atteint une bonne résolution pour la détection de l'apoptose (Boersma et al., 2005; Emoto et al., 1997). En considérant le niveau actuel des connaissances en imagerie nucléaire, le ^{99m}Tc -hynic-AnxV demeure sans doute le radioligand le plus utilisé en clinique pour la détection de l'apoptose. La méthode de conjugaison et la

biodistribution de ce groupe de dérivés radioactifs sont souvent rapportées comme des facteurs limitant son application clinique (Kemerink et al., 2001 a et b). En vue de pallier aux inconvénients reliés à l'utilisation des conjugués de l' AnxV, sa percée technologique exige, au préalable, des améliorations importantes de la spécificité tant au niveau du ciblage des tissus tumoraux, de la réduction de l'accumulation non spécifique de la radioactivité dans le sang et dans les organes vitaux.

I.6.5 Fondements de la méthode de détection de l'apoptose *in vivo*

i Approche

L'approche par pré-ciblage, introduite vers 1980, constitue une méthode potentielle permettant une atténuation des principaux désavantages rencontrés lors de l'utilisation de dérivés directement marqués de l' AnxV. Le concept de pré-ciblage est fondé sur la séparation dans le temps des étapes de ciblage et de détection (Guyon et al., 2005). La détection d'une cible peut facilement être réalisée par des injections successives de deux produits. Le premier possède une grande affinité de liaison avec la cible et l'autre, radioactif, détecte la présence du produit retenu par la cible par la formation d'une liaison stable. La clef du succès de la méthode en deux étapes, réside dans le fait que le produit responsable du ciblage doit être suffisamment éclairci du sang et des tissus normaux pour empêcher une accumulation non spécifique du radioconjugué (molécule effectrice, traceur). L'ajout d'une ou plusieurs étapes de clairance, entre le ciblage et la détection, vise à augmenter la spécificité du traceur mais aussi à amplifier le signal radioactif (Mirallié et al., 2005). L'utilité des étapes de clairance est d'éliminer les interférences sanguines pouvant capter non spécifiquement le traceur grâce à l'injection préalable de molécules non radioactives spécifiques possédant une affinité

similaire aux molécules détectrices. À ce jour, l'application potentielle de la stratégie de pré-ciblage en oncologie a été démontrée dans des modèles tumoraux animaux (Zimmermann et al., 2003; Wu et al., 2000), aussi bien que dans des essais cliniques, avec ou sans étape de clairance utilisant un conjugué radioactif comme molécule effectrice (Lewis MR et al., 2003; Cremonesi et al., 1999).

La stratégie la plus utilisée est basée sur le système biotine-(SAv)-Av (Sakahara et Saga T, 1999). L'attrait de ce système, extrêmement versatile, est basé sur la très forte affinité de l'Av ou de la SAv pour la biotine ($K_d = 10^{-15} \text{M}$). L'Av (66-kD, glycoprotéine présente dans le blanc de l'oeuf), s'accumule rapidement dans le foie (Sakahara et Saga T, 1999). La SAv (60-kD, la protéine produite par *Streptomyces avidin*) montre une vitesse de clairance plus lente et une plus faible incorporation non spécifique dans les tissus (Sakahara et Saga T, 1999). Les propriétés pharmacologiques de ces protéines indiquent que l'Av serait un bon agent de clairance tandis que la SAv aurait plus un profil de molécule effectrice.

ii Choix du radioisotope et synthèse du complexe radioactif

En imagerie nucléaire, les isotopes du cuivre attirent une attention considérable (Williams et al., 2005) parce qu'en raison de leurs propriétés d'émission, ils peuvent servir d'agents diagnostiques et thérapeutiques. Les propriétés et la disponibilité de ces isotopes radioactifs affectent les applications exactes dans lesquelles ils peuvent être employés. Le ^{64}Cu se désintègre par capture électronique (41%), β^- (40%, 573 KeV) et β^+ (19%, 656 KeV) accompagnée par une émission d'une radiation d'annihilation (38%, 511 KeV) et de photons γ (0,5%, 1,34 MeV). Sa demi-vie intermédiaire ($t_{1/2} = 12,7 \text{ h}$) permet une période d'imagerie prolongée pour pallier à sa faible sensibilité,

bien que la perte de contraste soit compensée par une amélioration de la résolution spatiale.

Cet émetteur de positrons est produit dans un cyclotron médical par le bombardement de protons sur une cible de ^{64}Ni (Zeisler et al., 2003; McCarthy et al., 1997) et s'incorpore facilement aux protéines par l'intermédiaire d'un chélateur (Lewis et al., 2001). L'acide 1,4,7,10-tetraazacyclododécane-1,4,7,10-tetra-acétique (DOTA) a été utilisé avec succès pour marquer des anticorps et peptides avec les isotopes radioactifs de cuivre. Le marquage d'une protéine avec le ^{64}Cu implique trois étapes simples (Lewis et al., 2003). Tout d'abord, le DOTA est couplé à la biotine, l'isotope radioactif est incorporé dans le DOTA et finalement la SAV est liée à la biotine pour former un complexe stable ^{64}Cu -biotine-DOTA-SAV.

iii Méthode de détection de l'apoptose in vivo

Dans le troisième article de cette thèse, une méthode de pré-ciblage en trois étapes a été sélectionnée pour détecter l'apoptose par imagerie TEP utilisant ^{64}Cu -DOTA-biotine-SAV (^{64}Cu -DOTA-biotine-SAV) comme traceur. Cette méthode se base sur la forte affinité de la SAV pour la biotine. Après implantation de deux tumeurs EMT-6 sur le dos de souris Balb/C, l'apoptose est induite par thérapie photodynamique (TPD), en utilisant des métallo disulfophtalocyanines (MPcS_2) comme PS et un laser comme source lumineuse. Les cellules apoptotiques sont pré-ciblées avec l'annexine-V biotinée après TPD, suivi par une seconde étape de clairance avec l'Av pour réduire la concentration sanguine des dérivés biotinés libres. Après une seconde période d'attente, la troisième étape débute par l'injection d'un nouveau complexe radioactif de la

SAv (^{64}Cu -DOTA-biotine-SAv) et l'apoptose est finalement détectée par tomographie d'émission de positrons (TEP).

I.7 Problématique, hypothèses et objectifs de la recherche

I.7.1 Problématique

L'efficacité de la TPD dépend des caractéristiques du PS et de son habilité à produire des espèces réactives de l' O_2 . Ces molécules sont transportées par voie sanguine, donc la vascularisation de la tumeur et l'hétérogénéité de la masse tumorale affectent sa dispersion. Le PS interagit surtout avec les protéines plasmiqes et cette interaction a un impact important sur sa distribution dans les tissus tumoraux et dépend fortement des propriétés physico-chimiques telles que: la solubilité, la charge ionique, la lipophilie et l'hydrophobie. Les produits hydrophobes peuvent traverser la membrane par diffusion passive ou par le biais d'une association avec des lipoprotéines et ainsi s'accumuler dans les cellules.

D'autre part, les produits hydrophiles ne traversent généralement pas l'espace interne de la membrane plasmique et exige une protéine comme l'albumine sanguine pour permittre leur internalisation. Ces produits sont généralement retenus dans les tissus conjonctifs de la tumeur. De plus, les espèces phototoxiques sont générées par le transfert d'énergie de l'état excité du PS à l' O_2 , provoquant la formation d'espèces réactives de l' O_2 . Ces espèces sont instables et hautement réactives, possèdent une très courte demi-vie (0,6 μs) et une zone de réactivité restreinte à 0,1 μm de son point de génération. Par conséquent, les zones de localisation coïncident fortement avec les

sites de photodommage. Ces sites déterminent le mécanisme de mort induit ainsi que les différentes voies activées pour la destruction de la cellule.

L'apoptose joue un rôle important dans la pathophysiologie de plusieurs maladies incluant le cancer. L'ampleur et le temps où l'apoptose se produit peuvent être importants en examinant l'information clinique potentielle dans la gestion des protocoles de traitement de cancer incluant la TPD. Pour cette raison, des efforts considérables ont été faits afin de développer et de valider des méthodes d'imagerie pour détecter l'apoptose *in vivo*. Les techniques les plus prometteuses pour détecter l'apoptose sont la spectroscopie par résonance magnétique ou l'imagerie nucléaire de radionucléides. La première technique est limitée par la sensibilité relativement basse et la résolution spatiale faible (Blackenberg et al., 1997). La deuxième technique exploite un événement hâtif de l'apoptose, la redistribution d'un composé de la membrane interne, la Pser, au feuillet externe de la membrane plasmique. L'externalisation de ce phospholipide est facilement détectée par l'annexine-V. Cet événement forme la base des méthodes radioactives pour détecter l'apoptose *in vivo* (Blackenberg et al., 1997). Cette technique est sélective et possède une bonne résolution (Boersma et al., 2003; Collingridge et al., 2003). L'utilisation de nouveaux conjugués radioactifs de l'annexine-V (^{99m}Tc , ^{94m}Tc , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{18}F , ^{111}In , ^{11}C , ^{64}Cu , ^{67}Ga et ^{68}Ga) a été rapportée dans quelques modèles expérimentaux (Lahorte et al., 2004; Boersma et al., 2005). Toutes ces études ont les mêmes objectifs, une synthèse simple et rapide du radioisotope stable, une exposition minimale aux tissus sains, une spécificité accrue et une bonne qualité d'image. La complexité et le rendement de la synthèse chimique, la stabilité, la demi-vie ainsi que la cinétique de clairance des radioconjugués limitent souvent leur utilisation pour les applications cliniques courantes (Kemerink et al., 2003; van de Wiele et al., 2003).

Cet outil puissant pourrait être employé afin de démontrer l'efficacité des traitements anticancéreux, d'estimer la progression ou la régression des maladies provoquées par un déséquilibre de la mort cellulaire, de visualiser les zones d'inflammation, de déterminer la tolérance ou le rejet des transplants, d'identifier les cellules endommagées des vaisseaux sanguins et des principaux organes (cœur et cerveau), d'estimer la gravité des maladies neurodégénératives, d'étudier les plaques de l'artériosclérose et d'évaluer la gravité de nombreux désordres immunitaires.

I.7.2 Hypothèses

La nature du PS joue un rôle important sur l'activité phototoxique. En raison de la courte demi-vie des espèces réactives (200 ns) et une distance de migration limitée (20 nm), la zone de localisation correspondrait à la zone de réaction. Ainsi les caractéristiques chimiques du PS influencent sa distribution dans les organelles, la gravité du photodommage et le type de mortalité induite. Considérant ces faits, notre hypothèse de travail se base sur l'existence d'une hydrophobie idéale permettant une distribution optimale du PS. Ce qui constitue un facteur déterminant sa sub-localisation. Le lieu précis de localisation du PS correspond à la zone réactionnelle. Cette zone déterminera le site de photodommage et le type de mécanisme de mort induit par ce produit. Une relation entre la structure chimique du PS et son potentiel photodynamique existe et peut être établie.

La perméabilité de la membrane plasmique contrôle le va-et-vient des molécules entre les compartiments intracellulaires et interstitiels. La structure chimique des PS influence la cinétique d'internalisation et la distribution à l'intérieur des couches lipidiques. La capacité des PS à traverser cette barrière détermine sa localisation et sa concentration intra membranaire. Au moment de l'illumination, l'intensité des domma-

ges induits à la membrane plasmique peut expliquer un effet plus marqué de la structure chimique sur l'activité photodynamique globale après un court temps d'incubation. La sélectivité de la membrane plasmique joue-t-elle un rôle primordial sur la cinétique d'internalisation en déterminant le profil de localisation des PS au moment de l'illumination pour modifier le destin des cellules? Ce profil dépend-il de la structure des PS?

Dans le troisième article, nous visons à développer une méthode de détection de l'apoptose induite par TPD au moyen du TEP. La détection des sites apoptotiques sera effectuée grâce à une approche de pré-ciblage en se basant sur les faits suivants : a) une synthèse simple et rapide du conjugué protéique radioactif par l'emploi du DOTA comme agent de chélation. b) l'emploi de la SAV radioactive permet une amplification du signal, c) l'ajout d'une étape de clairance permet de réduire l'interférence sanguine tout en augmentant la disponibilité du conjugué radioactif pour sa cible, 4) la grande affinité de l'Av ou SAV pour la biotine, 5) l'utilisation d'un dérivé biotiné non radioactif de la SAV assure une flexibilité d'adaptation permettant un ajustement des types et du temps d'injection ainsi que des délais entre les injections pour obtenir une accumulation optimale dans les zones apoptotiques selon le mécanisme d'induction de l'apoptose, 6) l'utilisation du TEP permet d'obtenir une meilleure résolution et une représentation tridimensionnelle des zones apoptotiques, 7) le cuivre⁶⁴ est un émetteur de positrons facilement produit dans un cyclotron médical et sa demi-vie intermédiaire nous donne un temps suffisant pour effectuer la synthèse tout en conservant une activité résiduelle convenable pour l'imagerie. De plus, cet isotope est aisément incorporé et conjugué à une protéine.

I.7.3 Objectifs de la recherche

Dans le premier article, nous désirons établir une relation entre l'activité photodynamique et la structure chimique d'une série de zinc trisulfophtalocyanine en évaluant l'effet de l'augmentation de leur hydrophobie. Le second article est une suite du premier. Nos premiers résultats montrent un effet plus important de la structure chimique des PS sur leur activité photodynamique après un court temps d'incubation. Nous désirons élucider l'importance du rôle de la membrane plasmique sur l'incorporation cellulaire du PS et de son activité globale. Dans le troisième article, nos objectifs visent à développer une méthode indirecte de détection de l'apoptose par imagerie TEP et d'évaluer son efficacité pour détecter l'apoptose induite par thérapie photodynamique dans un modèle tumoral animal.

II PREMIER ARTICLE

Structure-photodynamic activity relationships of substituted zinc trisulfophthalocyanines. N. Cauchon, H. Tian, R. Langlois, C. La Madeleine, S. Martin, H. Ali, D.J. Hunting, J.E. van Lier, *Bioconjugate chemistry* (2005) 16, 80-89.

II.1 Buts

Dans cet article, nous avons établi une relation entre l'activité photodynamique et la structure chimique d'une série de zinc trisulfophthalocyanines. Nous avons évalué l'effet de l'augmentation de l'hydrophobie et décelé la localisation intracellulaire des différents PS.

II.2 Hypothèses

La nature du PS joue un rôle important sur l'activité phototoxique. En raison de la courte demi-vie des espèces réactives (200 ns) et une distance de migration limitée (20 nm), la zone de localisation correspondrait à la zone de réaction. Ainsi les caractéristiques chimiques du PS influencent sa distribution dans les organelles, la gravité du photodommage et le type de mortalité induite. Une relation entre la structure et l'activité photodynamique existe et peut être établie.

***Structure-photodynamic activity relationships of substituted zinc
trisulfophthalocyanines***

Nicole Cauchon, Hongjian Tian, Réjean Langlois, Carole La Madeleine,
Stephane Martin, Hasrat Ali, Darel Hunting and Johan E. van Lier*

Department of Nuclear Medicine and Radiobiology, Faculty of Medicine,
Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada J1H 5N4.

Received June 30, 2004; Revised Manuscript Received October 20, 2004.

*To whom correspondence should be addressed. Tel: (819) 564-5409; Fax: (819) 564-5442. E-mail: johan.e.vanlier@ushervrooke.ca.

KEYWORDS: Sulfonated phthalocyanine, SAR, photosensitizer, photodynamic therapy, cancer

ABSTRACT

To identify optimal features of metallated sulfophthalocyanine dyes for their use as photosensitizers (PS) in the photodynamic therapy of cancer we synthesized a series of alkynyl substituted trisulfonated phthalocyanines and compared their amphiphilic properties to a number of parameters related to their photodynamic potency. Varying length of the substituted alkynyl side-chain modulates the hydrophobic/hydrophilic properties of the dyes providing a linear relationship between their n-octanol/water partition coefficients and retention times on reversed-phase HPLC. Aggregate formation of the dyes in aqueous solution increased with increasing hydrophobicity while monomer formation was favored by the addition of serum proteins or organic solvent.

Trisulfonated zinc phthalocyanines bearing hexynyl and nonynyl substituents exhibited high cellular uptake with strong localization at the mitochondrial membranes, which coincided with effective photocytotoxicity towards EMT-6 murine mammary tumor cells. Further increase in the length of the alkynyl chains (dodecynyl, hexadecynyl) did not improve their phototoxicity, likely resulting from extensive aggregation of the dyes in aqueous medium and reduced cell uptake. Aggregation was evident from shifts in the electronic spectra and reduced capacity to generate singlet oxygen. When monomerized through the addition of Cremophor EL all sulfonated zinc phthalocyanines gave similar singlet oxygen yields. Accordingly differences in the tendency of the dyes to aggregate do not appear to be a determining factor in their photodynamic potency. Our results confirm that the latter in particular relates to their amphiphilic properties, which facilitate cell up-

take and intracellular localization at photosensitive sites such as the mitochondria. Combined these factors play a significant role in the overall photodynamic potency of the dyes.

INTRODUCTION

Photodynamic therapy (PDT) is an alternative treatment for cancer and several other medical conditions requiring a concerted action of a PS, oxygen and light (1,2,3). Upon illumination with light of the appropriate wavelength (630-800 nm), the PS is excited to its triplet state, the excited PS interacts with its environment to produce highly reactive intermediates (for example, singlet oxygen, superoxide anion and hydroxyl radical) that are cytotoxic and cause tumor regression either directly by cell inactivation (4,5) and/or indirectly by destruction of the tumor vascular microcirculation (6,7,8). PDT using Photofrin[™] as a sensitizer has been approved for clinic treatment of many cancers world-wide, including cancer of the skin, mouth, esophagus, bladder, lung, breast and some reproductive organ (9,10). Advantages of PDT over other conventional cancer therapies are that neither the PS nor the light used for its activation are toxic, allowing the treatment to target diseased tissue selectively while sparing surrounding healthy tissue.

The well known limitations and drawbacks of Photofrin[™], i.e. chemical heterogeneity, relative low absorption coefficient at the activation wavelength of 630 nm and prolonged cutaneous photosensitivity, led to an extensive search for new, well-defined sensitizers with highly effective photoactivity and less side effects (11). Many different classes of new sensitizers have been advanced for PDT and are under development at various stages of preclinical or clinical trials (12). Among the second-generation PS for PDT, phthalocyanines (Pc) have received particular attention due to the selective retention by tumor cells, lack of toxicity, chemical and photochemical stability combined with a high

molar absorption coefficient ($\epsilon > 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, 640-710 nm) in the clinically useful red part of the spectrum (13). Non-substituted Pcs are extremely hydrophobic and insoluble in water. Sulfonation is a well documented method to render them suitable for use in biological systems. Sulfonated Pcs are water soluble and have been shown effective PS to kill tumor cells *in vitro* and tumor regression *in vivo*. We have previously synthesized zinc, gallium and aluminum Pc with various degrees of sulfonation by either condensation or sulfonation methods (14). Depending on the degree of sulfonation, Pc exhibit varying hydrophobic and hydrophilic properties, affecting the tendency to aggregate, changing their ability to generate $^1\text{O}_2$ and resulting in very different photodynamic effects (15). Hydrophobic PS tend to aggregate in aqueous solution (16), decreasing their photodynamic activity while hydrophilic PS display decreased cell uptakes (17), target less photosensitive sub cellular sites (18) and are rapidly cleared *in vivo* (19).

Many investigators have reported that photodynamic treatment induces lesions in mitochondria, lysosomes, Golgi, membranes and/or other organelles as well as essential biomolecules including DNA (20,21,22). PS rarely reach the cell nucleus and accordingly this target is less important for photodynamic cytotoxicity. The cytoplasmic organelles constitute the more accessible targets for PS mainly owing to the permeability of cytoplasmic membrane. Mitochondria are the principal target for most PS and damage to this organelle quickly induces cell death by apoptosis (9). Deregulation or dysfunction of the mitochondria induces fast cell death due to respiratory failure. The Golgi apparatus is a specialized type of endoplasmic reticulum involved in the transport of macromolecules and degradation products. Damage to the Golgi disrupts protein synthesis/routing and excretion of breakdown products. The lysosomes are the excretory vesicles produced by the

Golgi to eliminate undesirable compounds (exocytosis) and their rupture releases such materials together with harmful acidic hydrolases into the cytosol.

Cellular response to PDT-induced oxidative stress involves complex signal transduction pathways and alterations in gene expression leading either to repair of induced lesions, altered cell functions or to cell death (23). Even though specific damage to sub-cellular structures or functions has been demonstrated, it is difficult to show a clear causal relationship between intracellular damage and cell death (24). Furthermore, sensitivity to PDT differs a great deal between various cell types (25). Thus photodynamic activity depends largely on intracellular distribution pattern that in turn depend on both cell type and nature of the PS. The relative contribution of these various factors to the overall photodynamic response remains yet to be elucidated.

Under *in vitro* conditions amphiphilic PS are in general more photodynamically active than hydrophobic or hydrophilic molecules of the same class of compounds (26,17). It has also been suggested that favorable pharmacokinetics to ensure tumor selectivity and rapid systemic clearance is likewise related to the amphiphilic properties of the PS (10). Among the sulfophthalocyanine dyes, adjacently substituted, disulfonated compounds have the appropriate amphiphilic properties for optimal cell membrane penetration, resulting in high photodynamic activity both against tumor cells in culture and experimental animal tumors (27,28,29,30). However such derivatives are difficult to purify as single isomeric products. We have also demonstrated that addition of some hydrophobic groups onto fourth benzyl ring of trisulfonated Pc can improve their amphiphilic properties resulting in an increase in cell uptake and *in vitro* photocytotoxicity (31,32). Woehrle and collaborators showed that introducing different lengths of alkyl chains to a series of positive-

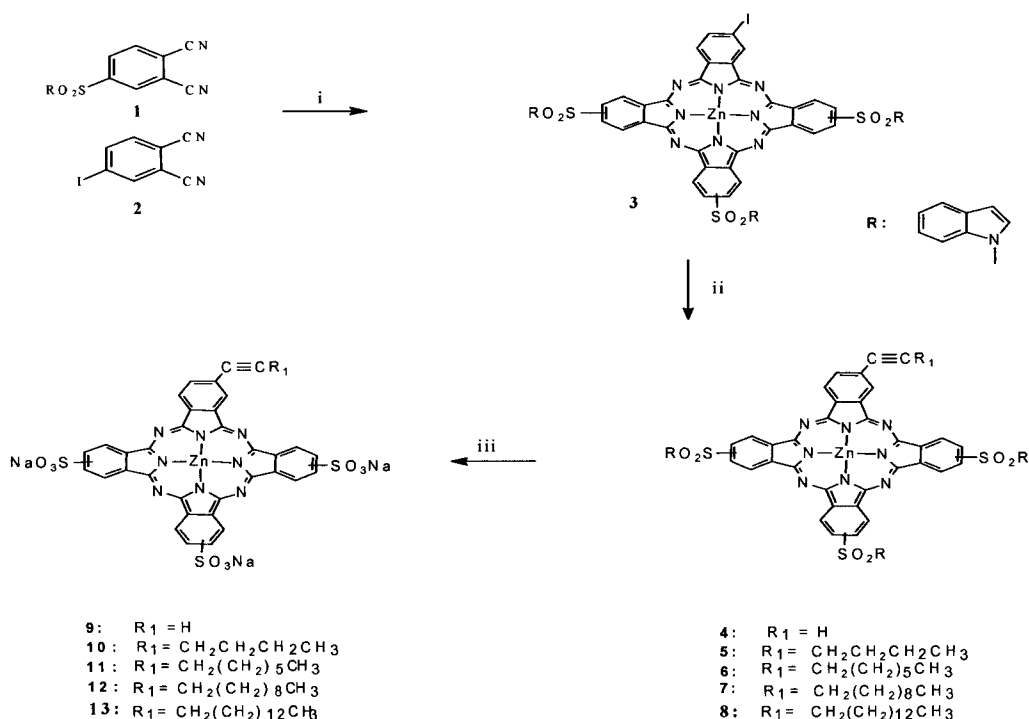
charged Pc tips the balance of the hydrophilic/lipophilic character of a Pc-based sensitizer (33). Pandey's studies on a series of purpurinimides containing alkyl substituents established that the overall lipophilicity did not affect singlet oxygen yields of the monomerized compound however the position of the alkyl groups was shown to play an important role in the *in vivo* efficacy of the PS (34).

Since the core of the Pc macro ring system is hydrophobic and peripherally attached sulfonate groups are hydrophilic, substituting different lipophilic alkyl chains onto a sulfonated Pc permits modulation of the amphiphilic properties of the dye. Using indole or pyrrole as a protecting group of the sulfonate substituent (35) in combination with the palladium catalyzed cross-coupling reaction (36) allowed us to prepare a series of novel trisulfonated Pc substituted with different lengths of alkynyl carbon chains on the fourth, non-sulfonated benzyl ring (37). In this paper we compare their amphiphilic properties to tendencies to aggregate, cell uptake, intracellular distribution and photocytotoxicity to arrive at structure–activity relationships.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Photosensitizers. The di- and trisulfonated zinc(II) Pc (ZnPcS_{2a} and ZnPcS_3) were prepared via condensation of sulfonated precursors and purified by extensive C-18 reversed-phase HPLC fractionation (Waters Corp., Milford, MA, USA; Column: RCM 8×10 , Millipore, Milford, MA, USA), using a linear gradient from 100 % aqueous 5.0 mM phosphate buffer (pH 5) to 100% methanol over 30 min (1.5 mL/min) (14). A preliminary note on the syntheses of the substituted trisulfonated Pc ($\text{ZnPcS}_3\text{C}_{2-16}$) has previously been reported (37). Briefly, their preparation involves the synthesis of the indole-protected

monoiodo ZnPcS_3I (**3**) via the mixed condensation of 1-(3,4-dicyanophenylsulfonyl)-indole (**1**) with 4-iodophthalonitrile (**2**) followed by facile purification over a silica gel column (Scheme 1). The protected monoiodo **3** was reacted with the different terminal alkynes under palladium/Cu(I) catalyzed conditions to yield the series of protected $\text{ZnPcS}_3\text{C}_{2-16}$ (**4-8**) with different functionalized alkynyl substituents. After further purification over a silica gel column the protected $\text{ZnPcS}_3\text{C}_{2-16}$ were hydrolyzed with lithium methoxide in methanol/THF to yield the pure alkynyl derivatives **9-13** in >85% yield



i: $\text{ZnAc}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 200-220 °C, 30 min, 19%; *ii:* Alkyne, $\text{PdCl}_2(\text{Ph}_3\text{P})_2$, CuI, THF, Et_3N , rt, 15-24 h, 85~95%; *iii:* LiOMe, MeOH, THF, reflux, 24 h, 80~85%.

Scheme II.1: Chemical synthesis of ZnPcS_3C_n

2-Iodo-9,16,23-tri(1'-indolylsulfonyl)phthalocyanine zinc(II) (3). 4-Iodophthalonitrile (**1**) (1 mmole) and 1-(3,4-dicyanophenylsulfonyl)indole (**2**) (3 mmole) and zinc acetate (5 mmole) were grounded together and heated at 200 °C for 2 h. The crude mixture

was dissolved in CHCl_3 and purified by silica gel column chromatography eluted with 5% ethyl acetate in toluene to yield **3** as a dark blue solid in 20%. UV-vis (CHCl_3) $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$ (log ϵ) 687.5 (5.26), 673.5 (5.26). ^1H NMR (DMSO-d_6) 9.2 (m), 8.8 (m), 8.4 (m), 8.22 (m), 8.18 (m), 7.9 (m), 7.4 (m), 7.2 (m), 6.7 (m).

General procedure for the coupling of 3 with alkynes. Compound **3** (0.1 mmole) and alkyne (0.13 mmole) were dissolved under N_2 in anh. THF (5 mL). To this was added $\text{Pd}(\text{ph}_3\text{P})_2\text{Cl}_2$ (18 mg), CuI (18 mg) and triethylamine (9 mL) and the mixture was heated at reflux for 15-24 h. The products were purified by silica gel column chromatography and isolated in 85-90% yield.

2-Ethynyl-9,16,23-tri(1'-indolylsulfonyl) PcZn(II) (4): UV-vis (CHCl_3) $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$ (log ϵ) 690 (5.26), 676 (5.26), 615 (4.65), 359 (4.90), MS (FAB) m/z calculated for $\text{C}_{61}\text{H}_{39}\text{N}_{11}\text{O}_6\text{S}_3\text{Zn}$ 1211.70, found, 1211.0.

2-(1'-Hexyne)-9,16,23-tri(1'-indolylsulfonyl) PcZn(II) (5): UV-vis (CHCl_3) $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$ (log ϵ) 691 (5.28), 676 (5.26), 613 (4.59), 361 (4.89), MS (FAB) m/z calculated for $\text{C}_{62}\text{H}_{39}\text{N}_{11}\text{O}_6\text{S}_3\text{Zn}$ 1195.62, found, 1195.1.

2-(1'-Nonyne)-9,16,23-tri(1'-indolylsulfonyl) PcZn(II) (6): UV-vis (CHCl_3) $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$ (log ϵ) 691 (5.28), 677 (5.26), 614 (4.60), 362 (4.88), MS (FAB) m/z calculated for $\text{C}_{65}\text{H}_{45}\text{N}_{11}\text{O}_6\text{S}_3\text{Zn}$ 1237.70, found, 1237.0.

2-(1'-Dodecyne)-9,16,23-tri(1'-indolylsulfonyl) PcZn(II) (7): UV-vis (CHCl_3) $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$ (log ϵ) 692 (5.27), 675 (5.25), 613 (4.59), 362 (4.90), MS (FAB) m/z calculated for $\text{C}_{68}\text{H}_{51}\text{N}_{11}\text{O}_6\text{S}_3\text{Zn}$ 1279.78, found, 1278.9.

2-(1'-Hexadecyne)-9,16,23-tri(1'-indolylsulfonyl) PcZn(II) (8): UV-vis (CHCl_3) $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$ (log ϵ) 692 (5.23), 676 (5.22), 614 (4.58), 362 (4.87), MS (FAB) m/z calculated for $\text{C}_{72}\text{H}_{59}\text{N}_{11}\text{O}_6\text{S}_3\text{Zn}$ 1335.89, found, 1234.9.

General procedure for the deprotection of indolylsulfonyl PcZn(II) 4-8. To a solution of lithium (80 mg) in MeOH (5 mL) was added **4-8** (50 mg) in THF (10 mL). The solution was refluxed for 24 h, the solvent was evaporated and the crude mixture was purified by medium-pressure reversed-phase C-18 column chromatography using MeOH and phosphate buffer (5 mmole; pH 5).

2-Ethynyl-9,16,23-trisulfosodium PcZn(II) (9): UV-vis (MeOH) $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$ (log ϵ) 671 (5.27), 607 (4.58), 344 (4.81), MS (Electron-spray) m/z calculated for $\text{C}_{34}\text{H}_{16}\text{N}_8\text{O}_9\text{S}_3\text{Zn}$ 842.11, found, 840.8 (M-1). ^1H NMR (DMSO-d_6) δ : 9.75 (m, 3H), 9.48 (m, 5H), 8.52 (m, 4H).

2-(1'-Hexyne)-9,16,23-trisulfosodium PcZn(II) (10): UV-vis (MeOH) $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$ (log ϵ) 671 (5.20), 607 (4.48), 344 (4.79), MS Electron-spray) m/z calculated for $\text{C}_{38}\text{H}_{24}\text{N}_8\text{O}_9\text{S}_3\text{Zn}$ 898.22, found, 896.9 (M-1). ^1H NMR (DMSO-d_6) δ : 9.72 (m, 3H), 9.38 (m, 5H), 8.50 (m, 3H), 8.18 (m, 1H), 2.72 (t, 2H), 1.85 (m, 2H), 1.28 (m, 2H), 1.15 (t, 3H, CH_3).

2-(1'-Nonyne)-9,16,23-trisulfosodium PcZn(II) (11): UV-vis (MeOH) $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$ (log ϵ) 671 (5.31), 607 (4.52), 345 (4.82), MS (Electron-spray) m/z calculated for $\text{C}_{41}\text{H}_{30}\text{N}_8\text{O}_9\text{S}_3\text{Zn}$ 940.30, found, 939.0 (M-1).

2-(1'-Dodecyne)-9,16,23-trisulfosodium PcZn(II) (12): UV-vis (MeOH) $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$ (log ϵ) 671 (5.30), 607 (4.51), 345 (4.81), MS Electron-spray) m/z calculated for

$C_{44}H_{36}N_8O_9S_3Zn$ 982.38, found, 981.0 (M-1). 1H NMR (DMSO- d_6) δ : 9.75 (m, 3H), 9.45 (m, 5H), 8.55 (m, 3H), 8.20 (m, 1H), 2.78 (t, 2H), 1.2-1.8 (m, 12H), 1.08 (t, 3H, CH_3).

2-(1'-Hexadecyne)-9,16,23-trisulfosodium PcZn(II) (13): UV-vis (MeOH) λ_{max}/nm (log ϵ) 678 (5.14), 607 (4.36), 356 (4.68), MS Electron-spray) m/z calculated for $C_{48}H_{44}N_8O_9S_3Zn$ 1038.49, found, 1037.8 (M-1). 1H NMR (DMSO- d_6) δ : 9.68 (m, 3H), 9.42 (m, 5H), 8.55 (m, 3H), 8.18 (m, 1H), 2.72 (t, 2H), 0.9-1.81 (m, 26H), 0.82 (t, 3H, CH_3).

Formulation of photosensitizers. To prepare the phosphate-buffered saline (PBS) dye solutions, a few mg of Pc were dissolved in PBS (pH 7.4) and sonicated for a few minutes. The solution was filtered on Millex-GV 0.22 μm (Millipore, Ont.) under sterile condition. The final concentration of the dyes was determined by UV-vis spectroscopy after 50-fold dilution in methanol or dimethylformamide (DMF).

The lipophilic properties of the dyes. The hydrophilic and hydrophobic properties of the various Pc were determined by their retention time (R_T) on C-18 reversed-phase HPLC and by their partition coefficient (P) between n-octanol and water.

a) Retention time. Analytical HPLC was conducted on a Waters' system composed of a model 600 pump, 2487 UV-visible detector, helium de-gasser, model 600 controller and a Rheodyne injector. The HPLC column consisted of a Radial-Pak cartridge (10 x 0,8 cm) filled with 4 μm Nova Pak C18 reversed-phase packing (Waters) and operated with a 1-30% linear gradient of methanol in aqueous 10.0 mM sodium phosphate buffer (pH 5.0) over a period of 30 min followed by isocratic elution with 100% methanol for 5 min, at 1.0 mL min $^{-1}$. Eluted Pcs were detected by the absorbency of the monomeric dyes at 670-700 nm and R_T were calculated as the weighed average of the R_T of the regional isomers.

b) Partition coefficient. To 2 mL of the various sulfonated ZnPc solutions (50 μM) in PBS (pH 7.4) was added 2 mL of n-octanol. The mixture was vortexed for 2 min, and then centrifuged 10 min (900 g) at room temperature to separate the phases. The concentrations of Pc in both phases was determined spectrophotometrically (U-2000, Hitachi) after diluting a sample 50-fold in DMF and measuring the absorbency at 340-360 nm ($\epsilon = 80,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). The Pc concentration found in n-octanol was then divided by that found in PBS to give the partition coefficient (P).

Spectral properties. The stock $\text{ZnPcS}_3\text{C}_{2-16}$ and $\text{ZnPcS}_{3/2a}$ solutions in PBS were diluted to 5 μM in different media (methanol, DMF, PBS, 1% and 55% FBS in Waymouth, 1% CRM in PBS) and incubated for different time intervals (0 h, 1 h and 24 h). The electronic spectra were recorded (U-2000, Hitachi, Japan) and evaluated for the degree of aggregation by calculating the absorbency of the monomer at about 675 nm and the aggregate about 635 nm from the deconvoluted spectra. The dye concentrations can be measured independently from their aggregation state by their absorbency at 340-360 nm ($\epsilon = 80,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

L-Tryptophan photooxidation (38). A solution of 1 mL containing ZnPcS (50 μM) and L-tryptophan (5 mM) in PBS with and without 1% CRM was irradiated in a glass test tube (16x100 mm). The light source consisted of a high intensity xenon short arc 300 W lamp model LX300F (ILC Technology, Sunnyvale, CA, USA). Light was fed through a liquid guide fiber optic (model 77556, Oriel Corp. Stratford, CT, USA) and two filters LS-700 and LL-600 (Corion, Holliston, MA, USA) thus transmitting light between 600-700 nm at a fluence rate of 150 mW cm^{-2} (measured with a Power-Energy meter model 365 with a

sensor model 38-0101, Scientech, Boulder, CO, USA). The solution was kept at 4°C and bubbled with air to ensure O₂ saturation. After 2 and 4 min of illumination, 80 µL samples were collected and analyzed by HPLC to quantify the characteristic hydroperoxide products 3α-hydroperoxy-1,2,3,3α,8,8α-hexahydropyrrolo [2,3β] indole-2-carboxylic acid (HPPI isomers) (R_T HPPI = 13.5 min and 18.0 min, R_T tryptophan = 30.0 min) derived from ¹O₂ oxidation of tryptophan. The relative HPPI yield for each PS was measured from the HPPI chromatogram peak areas, taking the area produced by AlOHPCs₄ as 100%. HPLC analysis was done on a Radial Pak cartridge (10x0.8 cm) filled with 4 µm Nova Pak C₁₈ reversed-phase packing eluted at 1.0 mL/min with a linear gradient of 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) in water and methanol (0.1% TFA) over 30 min from (1 to 30% methanol). The UV-vis detector was set at 215 nm.

Cell cultures. The cell line used was the EMT-6 murine mammary tumor line, maintained in Waymouth medium culture (Gibco, Burlington, Canada) supplemented with 15% fetal bovine serum (FBS), 1% glutamine and 1% pen-strep (Gibco). This corresponds to a complete medium.

Cell uptake of dyes. The EMT-6 cells (1.5×10^5 cells per well) in 1 mL Waymouth's growth medium were incubated in 24 multi-well plates (Falcon) overnight at 37°C under 5% CO₂. The medium was removed, the monolayer rinsed twice with PBS and then overlaid with 500 µL of the dye solution (10 µM) in medium culture supplemented with 1% FBS. For the longer incubation times of 24 h and 48 h the medium was supplemented with 4% of FBS to reduce cell death. After the incubation the dye solution was removed and

the cells were washed twice with PBS. The cells were lysed with 500 μ L of 0.1 N NaOH. An aliquot (50 μ L) was removed to determine cellular protein according to the Bradford method (Bio-Rad Protein Assay) (39). DMF (450 μ L) and PBS (100 μ L) were added to the remaining cell lysate, centrifuged for 30 min at 4°C, 3500 rpm and dye concentration in the clear supernatant was assayed by fluorescence spectroscopy (F-2000, Hitachi) (λ_{ex} = 608 nm, 5 nm band pass, λ_{em} = 687 nm, 5 nm band pass). Standard curves were made using cell lysates treated as above with known amounts of the appropriate Pc solution added. The results were expressed as nmole of Pc per mg of cellular protein.

Intracellular distribution. The cell suspension (1×10^5 cells/mL) was plated onto glass cover slips and incubated for 18-24 h at 37°C, 5% CO₂ to allow for cell adhesion. The medium was removed, the cells were rinsed twice with PBS and then overlaid with 1 mL of the dye solution (10 μ M) in medium culture supplemented with 1% FBS. After 3 h at 37°C, the dye solution was removed and the cells were washed twice with PBS and twice more with low phosphate buffer (HBSS/HEPES). The cells were incubated at 37°C under 5% CO₂ with different tracker dyes (Invitrogen Inc., Ontario, Canada) including SYTO 13 (10 nM, 1 h), Myto-Tracker Green (150 nM, 45 min), Lyso-Tracker Green (200 nM, 1 h), TMA-DPH (5 μ M, 1 h) and NBDC6 Ceramide (5 μ M, 1 h). Only the latter dye needs to be rinsed three times with the same buffer where after new medium is added and the cells are incubated for another 30 min.

After the last incubation, all samples were washed twice with PBS and mounted for microscopic observations. Cells were examined with a scanning confocal microscope (NORAN Instruments Inc, Middleton, WI) coupled to an inverted microscope with a 100x oil immersion objective (Nikon). Specimens were excited by krypton/argon laser at 488

nm or 568 nm and emitted fluorescence was measured using barrier filters (525/25 nm band pass or 590 nm long-pass, respectively). Optical sections were collected at 0.25- μ m intervals with 10 μ m pinhole aperture (minimal opening in order to yield a maximal confocal component). Digitized images of 512x480 pixels were obtained with 256 times line averaging and enhanced with Intervision software (NORAN Instruments Inc) on a Silicon Graphics O2-workstation (Mountain View, CA).

Cell photoinactivation. Cell cultures were trypsinated to give a 1.5×10^5 cells/mL suspension of which 100 μ L per well were plated in 96 multi-well plates and incubated overnight at 37°C under 5% CO₂. One column did not receive cells to serve as a blank. Attached cells were rinsed twice with PBS and incubated with 50 μ L of dye solution (1 μ M) in Waymouth 1% FBS for 1 h or 24 h. One control column was filled with dye-free Waymouth 1% FBS. The cells were then rinsed twice with PBS, refed with 100 μ L of Waymouth 15 % FBS and exposed for varying time intervals to red light (10 mW cm⁻² at 660-700 nm). Plates were incubated overnight at 37°C under 5% CO₂. Cell survival was measured by a colorimetric method, using the tetrazolium salt MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) (Sigma). Eight-fold replicates were run and experiments were repeated at least three times.

MTT assay. This assay was adapted from the method described by Tada *et al.* (40). A stock solution of MTT at 0.5% in PBS was prepared and kept at 4°C in the dark. The solution was diluted 5-fold in Waymouth 15% FBS and 50 μ L was added in each well. After 4 h incubation (37°C, 5% CO₂), 100 μ L sodium dodecyl sulfate (10% in 0.01 N HCl) was added to the wells to stop MTT reduction and to dissolve the blue formazan crystals pro-

duced by mitochondrial hydrogenases in living cells. After 24 h incubation, the plates were read on a microplate reader (Molecular Devices, Thermomax) for their optical densities at 570 nm. The survival curves were plotted as a function of light dose and LD₉₀ values were calculated.

RESULTS

Table II.1: n-Octanol/water partition coefficients (P), reversed-phase HPLC retention times (R_T), tryptophan photooxidation yields (HPPI) and monomer concentration of PcS in various solvents.

Sensitizer	¹ P ($P \times 10^{-3}$)	² R_T (min)	³ HPPI		⁴ Monomer formation				
			PBS	CRM	PBS	CRM	methanol	1%FBS	55%FBS
AlOHPcS ₄	n.a	8.6	0.97	1.00	40.4	66.8	n.a	n.a	n.a
ZnPcS _{2a}	5.6 ± 0.9	25.5	0.18	1.16	9.6	62.4	58.8	16.0	51.4
ZnPcS ₃	1.33 ± 0.5	22.4	0.29	1.14	10.4	83.4	95.4	12.6	23.4
ZnPcS ₃ C ₂ (9)	3.5 ± 0.5	23.4	0.09	1.15	7.2	59.8	57.0	9.0	16.8
ZnPcS ₃ C ₆ (10)	26.9 ± 6.0	27.2	0.05	1.15	4.2	81.0	68.0	6.6	18.8
ZnPcS ₃ C ₉ (11)	34.2 ± 4.0	28.8	0.03	1.25	2.4	99.6	46.2	5.0	15.2
ZnPcS ₃ C ₁₂ (12)	38.7 ± 5.0	29.9	n.d.	1.26	1.0	75.8	60.2	8.8	15.2
ZnPcS ₃ C ₁₆ (13)	43.0 ± 7.0	31.3	n.d.	1.11	3.0	88.0	52.8	4.6	6.0

¹ P: n-Octanol/water partition coefficient. ² R_T : HPLC retention times of PcS (in min, weighed average of regional isomers) on a C-18 reversed-phase column. ³ The relative amount of hydroperoxide (HPPI) formed from the photooxidation of L-tryptophan using different PcS in PBS (with and without 1% CRM) is expressed relative to that obtained with a standard (AlOHPcS₄). The quantum yield for singlet oxygen production of AlOHPcS₄ is 0.4. ⁴ The monomer concentration was estimated from its molar absorbance at 675 nm after deconvolution analysis and expressed as % of total PcS (5 μ M). n.d.: No detectable HPPI formation.

Lipophilic properties of the dyes. The retention times (R_T) of the substituted ZnPcS₃C_n on reversed-phase HPLC and their partition coefficients (P) between n-octanol and water are summarized in Table II.1. A plot of log P versus the retention time on HPLC shows a linear correlation (Figure II.1). R_T values of the ZnPcS₃C_n increase with increasing “n”, i.e the length of the alkynyl side chain, reflecting their increased lipophilicity.

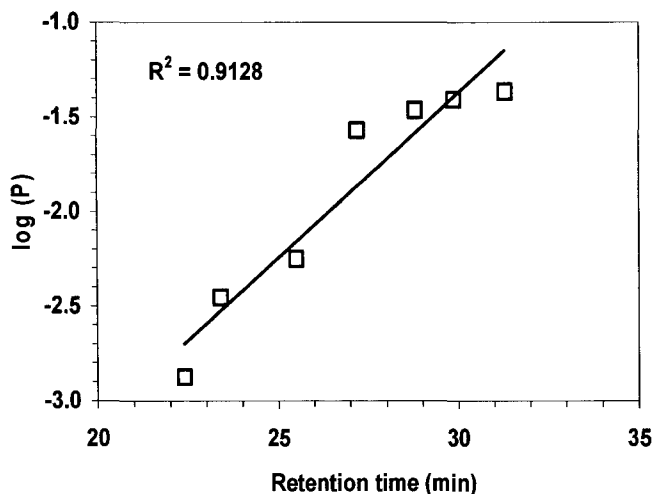


Figure II.1: n-Octanol/water partition coefficient ($\log P$) vs. reversed-phase HPLC retention time (R_T).

Addition of a six carbon chain to the ZnPcS_3 to give ZnPcS_3C_6 (**10**) increases the R_T from 22.4 to 27.2 min, which is similar to the R_T of the adjacent substituted disulfonated ZnPcS_{2a} (25.5 min) suggesting that their amphiphilic characters are comparable. The partition coefficients indicate however that the ZnPcS_3C_6 (**10**) is more lipophilic than the ZnPcS_{2a} .

Spectral properties. The spectra of all dyes in PBS show a strong absorption peak at 460 nm, a characteristic peak of the monomer at 675 nm and a characteristic peak for the aggregated dye at 630 nm (Figure II.2). Aggregation of the monomers results in a blue shift of the Q band, from 675 nm to 630 nm while the intensity of the absorption band at 460 nm remains constant (15,41,42,43). In Waymouth 1 % FBS the intensity of the aggregate peak at 630 nm is decreased while the intensity of monomeric Q band at 675 nm is in-

creased. Augmenting the FBS concentration to 55% further increases the absorption peak at 675 nm.

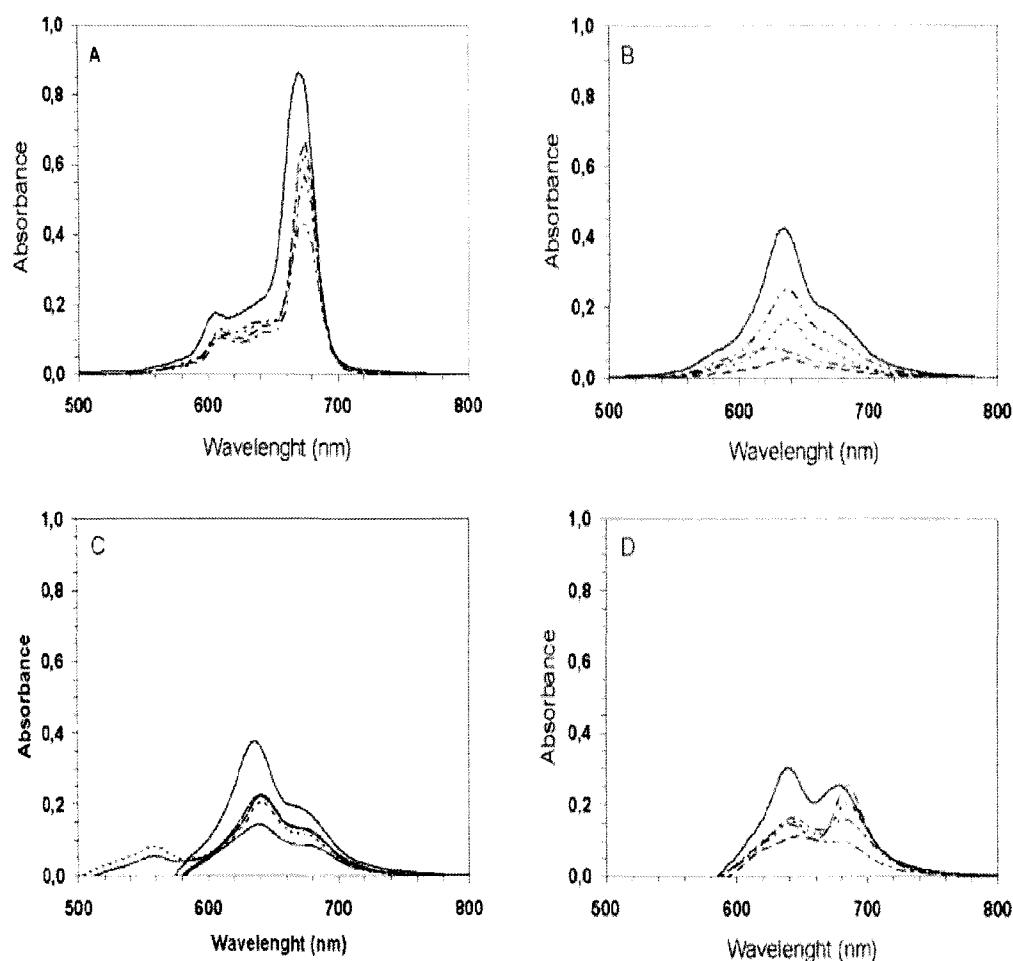


Figure II.2: Absorption spectra of ZnPcS_3 (—), ZnPcS_3C_2 (---), ZnPcS_3C_6 (···), ZnPcS_3C_9 (- · - ·) and $\text{ZnPcS}_3\text{C}_{16}$ (- - - ·) in different media. **A:** methanol, **B:** PBS, **C:** Waymouth's +1% FBS, **D:** Waymouth's + 55% FBS.

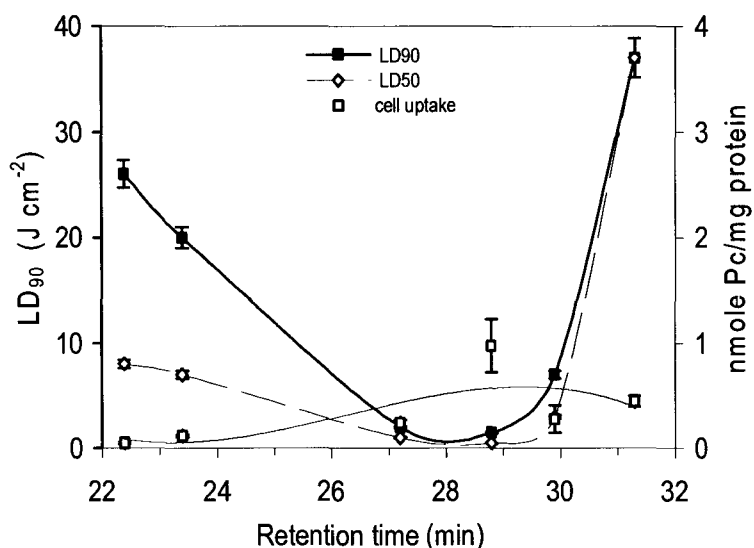
This suggests that binding of the Pc to FBS proteins facilitates the formation of monomers. In methanol and DMF the monomeric peak at 675 nm is prominent for most of the ZnPcS_3 derivatives. Addition of an emulsifier such as Cremophor EL (1%) to an aqueous solution of the dye likewise results in monomerization of the aggregates. Examples of

the spectral shifts in different media are presented in Figure II.2a-d. To estimate the concentration of monomeric or aggregated Pc in different media deconvolution spectra of the overlapping absorption peaks were generated. To this end the spectra were analyzed by a Lorentzian non linear curve fit (44). Table II.1 summarizes the monomer concentration (μM) of the various sulfonated ZnPc ($5 \mu\text{M}$) measured in five different media after an equilibrium period of 24 h. In all media a relationship between retention time (R_T) and the monomer concentration is evident with the highest percentage of monomers occurring for the hydrophilic ZnPcS_3 lacking the hydrocarbon side chain (graphs not shown). Monomerization is minimal in PBS. The addition of 1% FBS has little effect, while 55% FBS results in a balance between the concentration of monomer and aggregate except for $\text{ZnPcS}_3\text{C}_{16}$ (**13**), which is not affected. In contrast the monomer concentration of ZnPcS_{2a} increases by 5-fold upon addition of 55% FBS, approaching the monomerization level obtained in methanol. In methanol, the monomer concentration of all sulfonated ZnPc derivatives is higher than $2.3 \mu\text{M}$, with the non-substituted ZnPcS_3 approaching near 100% monomerization.

L-Tryptophan photooxidation. Upon excitation, phthalocyanine monomers generate $^1\text{O}_2$, which in turn can photooxidize lipids and amino acids such as L-tryptophan. L-Tryptophan photooxidation yields characteristic hydroperoxide isomers (HPPI) that can be quantified using HPLC. Singlet oxygen quantum yields ($\Phi ^1\text{O}_2$) can be established by comparison of the HPPI yields of the ZnPc with AlOHPCs_4 ($\Phi ^1\text{O}_2 = 0.43$) (45). Table II.1 shows the HPPI hydroperoxide yields for the various ZnPcS derivatives together with their monomer concentrations. In PBS the photooxidation of L-tryptophan is greatly decreased when ZnPcS_3 is substituted with lipophilic chains to give ZnPcS_3C_n . This is in agreement with

their absorption spectra that indicate that the ZnPcS_3C_n are highly aggregated in this medium. However, addition of 1% CRM results in > 60% monomerization revealing that all ZnPcS_3C_n have similar capacities to generate $^1\text{O}_2$, which are higher than that of the reference dye AlOHPcS_4 .

Cell uptake. Dye uptake by the EMT-6 cells as a function of incubation time is presented in Figure II.3. The concentrations in nmole Pc per mg cell protein after 1 h and 24 h incubation with 10 μM ZnPcS are shown together with cell survival after PDT with 1 μM ZnPcS as a function of the light dose required for 50% and 90% cell kill (LD_{50} and LD_{90}). After 1 h of incubation, ZnPcS_3C_9 (**11**) shows the highest uptake among the various ZnPcS_3C_n . Prolonged incubation of 24 h results in further increase of the dye concentration by about an order of magnitude. ZnPcS_3 substituted with longer aliphatic side chains ($n > 9$) are taken up by the EMT-6 cells to a lesser extent.



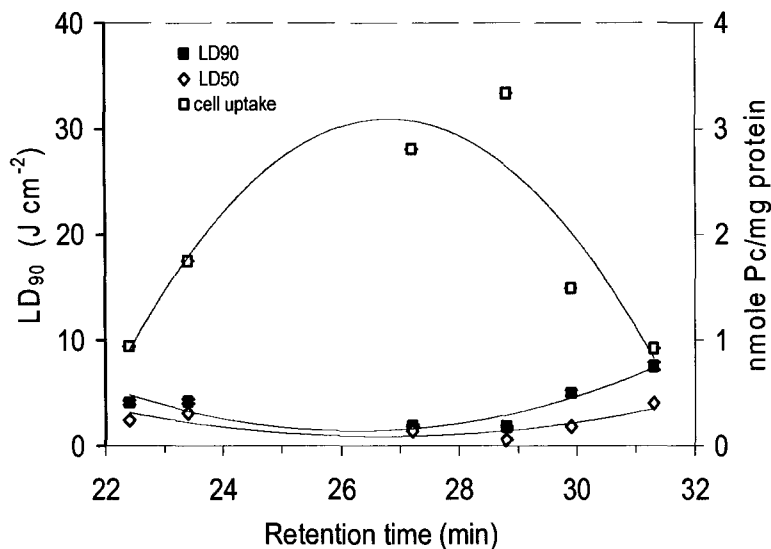
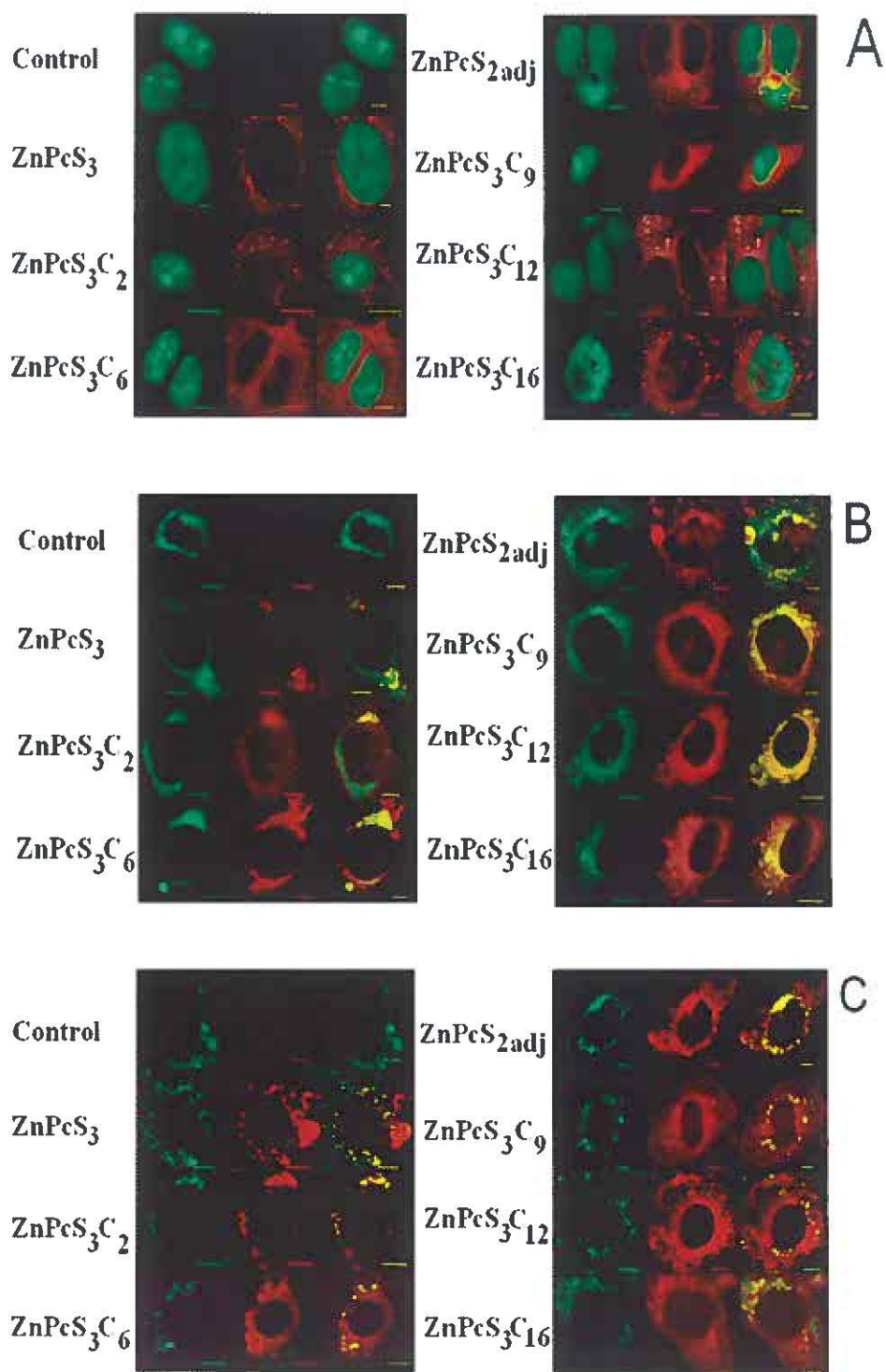


Figure II.3: Comparison of EMT-6 cell phototoxicity (LD90 and LD50 in J cm⁻²) and cell uptake (in nmole Pc/mg protein) of a series of ZnPcS derivatives as a function of their HPLC retention times, after (A): 1h and (B): 24h incubation periods.

Intracellular distribution. Figure 4a-e shows the intracellular localization of the ZnPcS derivatives (10 μ M) in EMT-6 cells after 3h incubation, together with the localization of different tracker dyes. The presence of the ZnPcS is evident from their red fluorescence (Figure II.4, center images). The different tracker dyes are detected by their intense green fluorescence (left images), while co-localization with the ZnPcS results in a yellow fluorescence (right images). The ZnPcS are mainly localized in the cytoplasm (Mitochondria (Figure II.4a), Golgi (Figure II.4b) and lysosomes (Figure II.4c)) while almost excluded from the cell nucleus (Figure II.4d). The sensitizers mostly cross the cytoplasmic membrane by passive diffusion, however co-localization with the tracker dyes in Golgi and lysosomes indicates that part of the transport involves endocytosis. The latter is confirmed by the detection of ZnPcS as a punctuate pattern co-localized with membrane tracker dye (Figure II.4e). The parent ZnPcS₃ and its analog substituted with a short C2 chain exhibit similar distribution pattern while substitution with the longer C12 and C16 chains reduces

uptake in the cytoplasmic organelles. The most amphiphilic ZnPcS_{2a} , ZnPcS_3C_6 (10) and ZnPcS_3C_9 (11) show the highest accumulation in the mitochondria (Figure II.4).



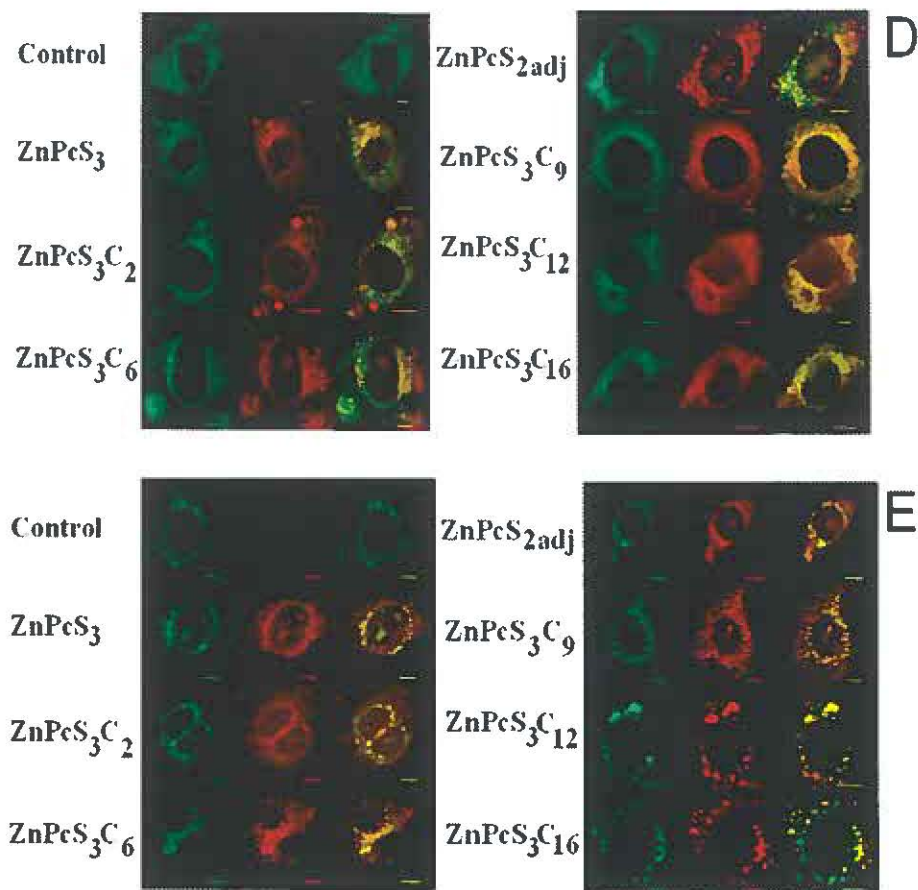


Figure II.4: Comparative intracellular localization of ZnPcS derivatives (10 μ M) in EMT-6 cells after incubation for 3h (center images) with various tracker dyes (left images) and superimposed images (right images). A: nucleus (syto 13), B: mitochondria (myto-tracker green), C: lysosomes (lyso-tracker green), D: golgi (NBD-6 Ceramide) and E: endocytose (TMA-DPH).

Photocytotoxicity. No dark toxicity towards EMT-6 cells was observed with any of the dyes under study up to 100 μ M over a 24 h incubation period in Waymouth 1% FBS. LD₅₀ and LD₉₀ after 1h and 24h incubation with the dyes as a function of light dose ($J\ cm^{-2}$) are summarized in Table II.2 and were derived from the corresponding survival curves (not shown). In order to directly compare cell uptake with photocytotoxicity of the ZnPcS₃C_n-series, the LD₅₀, LD₉₀ and cell uptake values vs. retention time are shown on the same

plots (Figure II.3). The most photoactive dye is the ZnPcS_{2a} followed by ZnPcS_3C_6 (**10**) and ZnPcS_3C_9 (**11**). The latter exhibit substantial higher photocytotoxicity than the parent ZnPcS_3 or the ZnPcS_3C_n bearing the shorter ($n=2$) or longer ($n=16$) alkynyl side chain.

Table II.2: Phototoxicity and EMT-6 cell uptake of a series of ZnPcS derivatives.

Sensitizer	1 h			24 h		
	¹ Cell uptake	² LD ₅₀	² LD ₉₀	¹ Cell uptake	² LD ₅₀	² LD ₉₀
ZnPcS_{2a}	0.16 ± 0.04	0.5	1.0	1.75 ± 0.06	0.2	0.6
ZnPcS_3	0.05 ± 0.01	8.0	26.0	0.94 ± 0.02	2.4	4.1
ZnPcS_3C_2 (9)	0.12 ± 0.01	7.0	20.0	1.75 ± 0.15	3.1	4.2
ZnPcS_3C_6 (10)	0.24 ± 0.03	1.0	2.0	2.81 ± 0.07	1.4	1.9
ZnPcS_3C_9 (11)	0.97 ± 0.25	0.5	1.5	3.34 ± 0.10	0.6	1.8
$\text{ZnPcS}_3\text{C}_{12}$ (12)	0.28 ± 0.13	3.0	7.0	1.49 ± 0.10	1.8	5.0
$\text{ZnPcS}_3\text{C}_{16}$ (13)	0.45 ± 0.05	>37.0	>37.0	0.92 ± 0.05	4.0	7.5

¹ EMT-6 cells were incubated with ZnPcS (10 μM) for 1h or 24h and analyzed for dye content as described under materials and methods. Values are in nmole Pc per mg of cell protein (\pm SEM). ² The LD₅₀ or LD₉₀ is the light dose (J cm^{-1}) required to induce cell survival by 50% or 90% after incubating EMT-6 cells with 1 μM dye for 1h or 24h.

DISCUSSION

In this study we compare the hydrophilic/lipophilic properties of a series of structurally related sulfonated Pc dyes with a number of parameters that impact on their photodynamic potential. The lipophilic properties of the various ZnPcS_3C_n were determined by two methods, n-octanol/water partition coefficient (P) and reversed-phase HPLC retention time (R_T). The first shows the preference of the dyes for organic solvent (n-octanol) and the second determines the strength of hydrophobic interactions. Both methods give a measure of the lipophilic properties of the dyes and the relationship between these two parameters was shown to be linear (Figure II.1). Longer R_T correlate with a higher partition coefficient (log P) reflecting stronger lipophilic properties of a given dye.

Singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) yields have been shown inversely proportional to the extent of aggregation of a sensitizer (15,43). Tendency to aggregate is largely modulated by the ring substituents and the nature of axial ligands on the central metal ion. Monomeric Pc molecules with identical central metal ion and varying degrees of sulfonation retain the same photochemical activity. Pc aggregation is easily detected by a 30-50 nm blue-shift of the Q band around 675 nm to yield a broad and less absorption peak around 630 nm in the UV-vis absorption spectrum (15). Upon excitation with light, aggregated photosensitizers dissipate their energy through internal conversion to the ground state rather than triplet formation with subsequent singlet oxygen production (16). Hydroperoxide (HPPI) formation from L-tryptophan by our ZnPcS in PBS increased proportionally with the monomer concentration (Table II.1). The more lipophilic compounds with longer HPLC retention times aggregated more readily in aqueous solution, thus reducing their photochemical activities. When the Pc derivatives were solubilized in 1% Cremophor EL,

HPPI formation of all ZnPcS_3C_n derivatives surpassed that of the reference AlOHPcS_4 (Table II.1). Margaron *et al.* reported similar findings using a series of ZnPc , where the most lipophilic compound, a tetraiodinated ZnPc entered the cells to a lesser extent due to low affinity for the plasma membrane (26).

It is generally believed that amphiphilic properties of photosensitizers play a significant role in their efficiency in photodynamic therapy (46). We previously reported that increasing the number of sulfonated groups on a metallo Pc led to a decrease in the photocytotoxicity under both *in vitro* and *in vivo* conditions, which coincided with decreased cellular uptake (47,48). The disulfonated dye bearing two sulfonated groups on adjacent benzyl rings was found to be the most photoactive derivative. On the other hand, it was reported that amphiphilic dyes interact with the lipid portion of plasma membranes (49), thereby facilitating their transport into the cell (27). It has also been reported that the same amphiphilic properties allows for more efficient binding to low density lipoprotein (LDL), which has been implicated in the transport of porphyrin-based sensitizers to tumor tissue (17). Amphiphilic properties of sulfonated Pc strongly correlate with their cell uptake and photocytotoxic potency (26). Our current data confirm that adding a lipophilic hydrocarbon side chain to ZnPcS_3 improves cell uptake (Table II.2). However adding longer chain lengths, e.g. $n>9$ for ZnPcS_3C_n , results in a decrease in cell uptake providing a parabolic relationship between cell uptake vs. retention time, inverse to that observed for phototoxicity vs. retention time (Figure II.3). This is particular evident after a 24h incubation period (Figure II.3B). Comparing the LD_{90} of the ZnPcS_3C_n with their relative cell uptake values, both after a 1-h and 24-h incubation periods, reveals a linear regression with higher cell uptake capacity correlating to lower photocytotoxicity (Figure II.5).

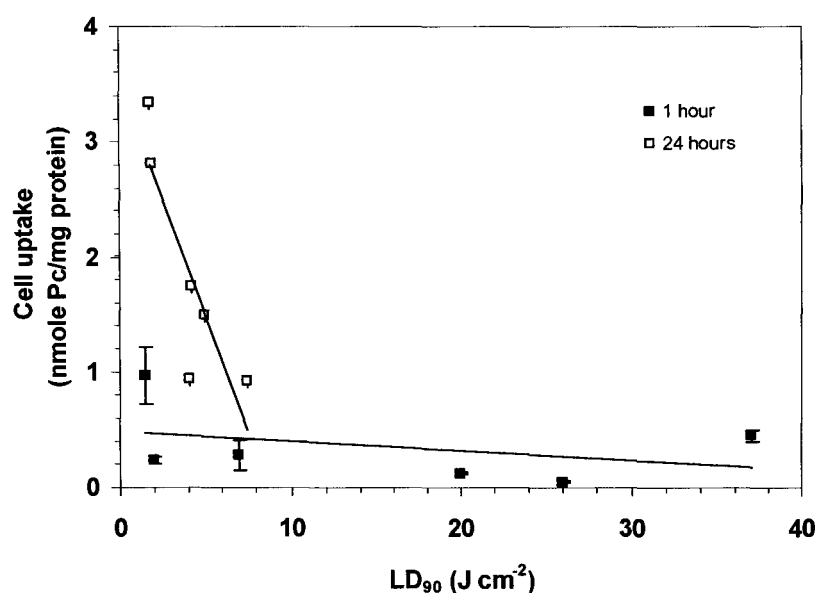


Figure II.5. Comparison of EMT-6 cell uptake and phototoxicity (LD₉₀ and LD₅₀) of a series of ZnPcS derivatives after 1 h (■) and 24 h (□) incubation times.

This phenomenon is particularly evident after the shorter 1-h incubation period. This confirms that variations in cellular phototoxicity between the dyes can not simply be explained by differences in cell uptake. Instead, our data strongly suggest that variations in cell uptake rates and intracellular distribution pattern are responsible for differences in photoactivity.

On such account we examined possible correlations between amphiphilicity and tendencies to aggregate, which in turn could impact both on cell uptake kinetics and capacity to produce singlet oxygen as well as intracellular localization pattern. Increasing hydrophobicity of ZnPcS₃ by the addition of lipophilic side chains affects the tendencies to aggregate in a milieu-dependent manner. In PBS or culture medium, with the addition of 1% FBS protein, aggregation remains high and similar for all derivatives tested (Table

II.1). These data show that the most hydrophilic parent ZnPcS_3 is in fact the least aggregated. Adding 55% protein to the medium breaks up the stacked ZnPcS aggregates, resulting in doubling of the monomer concentration to $\sim 20\%$. Only the $\text{ZnPcS}_3\text{C}_{16}$ is less affected by the added protein and its monomer concentration remains low (6%). In contrast ZnPcS_{2a} interacts strongly with protein resulting in a 5-fold increase of the monomer concentration ($>50\%$). In methanol monomerization is high, i.e. above 50% for most dyes tested. Of the five media the aqueous buffer fortified with 55% FBS most closely mimics the intracellular environment where the dyes localize, suggesting that a similar monomerization process occurs at the cellular level. This implies that amphiphilicity of the dye plays an important role in reaching optimal monomer/aggregated ratios at the target site, contributing to the desired phototoxic effects.

Longer side chains facilitate aggregation of the dyes resulting in loss of their capacity to generate singlet oxygen, a phenomena that is confirmed by their diminished capacity to photooxidize L-tryptophan to its characteristic HPPI hydroperoxide products (Table II.1). Steric hindrance may also contribute to diminished cell uptake and loss of phototoxicity. Rosenthal *et al.* attributed the absence of significant uptake of the lipophilic tetra-neopentoxo ZnPc to steric hindrance of the bulky neopentoxo groups (50). We previously demonstrated that adding long axial hydrocarbon chains to silicon naphthalocyanine increased their hydrophobicity, but that increased steric hindrance reduced cellular uptake resulting in reduced cellular phototoxicity (51).

However, differences between the intracellular localization patterns of the dyes may yet play the most important role in exerting their photodynamic action. The high reactivity of the cytotoxic singlet oxygen produced upon photoexcitation of the dyes limits their action range such that most of the photodamage occurs at the site where the dyes localize

(24). The importance of intracellular localization relates to the many cytoplasmic targets, the extend of the damage generated and the capacity of the cell to repair these injuries. The nucleus' DNA is prone to damage and as such is the first target to consider in cell death. However access to the nucleus is limited due to the selectivity of the nuclear membrane. Our phthalocyanines, as well as other photosensitizers tend to accumulate on the surface of nuclear membrane without traversing this barrier (Figure II.4A). Even though the nucleus is not directly affected by our phthalocyanines its role in cell death after PDT is evident since damage at other intracellular sites initiates a cascade of biochemical reactions that affect the nucleus indirectly (20).

Our ZnPcS_3C_n localize mainly at the mitochondria and Golgi apparatus (Figure II.4 B,C). There are however significant differences between the dye preparations with the most amphiphilic ZnPcS_3C_6 and $-\text{C}_9$ giving the highest co-localization with mitotracker green. Shorter or longer lipophilic side chains show reduced uptake. Further more, uptake by the lysosomes provides an active pathway to attack vital organelles as part of the overall photodynamic response. The relationship between the intracellular localization pattern of our ZnPcS and their photodynamic potency obviously does not constitute the only parameter to consider. Other factors that may play a role include the quantity of singlet oxygen produced, interaction between different organelles within the cell, the extent of damage, changes in permeability of the various membrane structures, cell uptake kinetics, etc. Evaluation of all such parameters is essential to establish a reliable structure-photodynamic activity relationship and experiments to this end are currently in progress.

In summary, the amphiphilic properties of trisulfonated ZnPc can be improved by introducing a lipophilic alkynyl chain to the Pc macro cycle. The amphiphilic properties

of the ZnPcS_3C_n play a key role in cell uptake and photocytotoxicity, and also affect the aggregation of sulfonated Pc in biological systems. Adding a C6-C9 linear carbon chain to ZnPcS_3 (ZnPcS_3C_6 and ZnPcS_3C_9) gave Pc that readily localized in the mitochondria and the Golgi apparatus resulting in comparable photodynamic activities as those reported for the amphiphilic, adjacent disulfonated ZnPcS_{2a} , which is considered as one of the most active sulfonated Pc-based photosensitizers for PDT. The advantage of these new derivatives over ZnPcS_{2a} as potential photosensitizers for PDT lies in their chemistry: They are more easily prepared and purified to give well identified products.

ACKNOWLEDGMENT: *This work was supported by the Canadian Institutes for Health Research (CIHR grant MOP-37768). The authors are grateful to Dr. Leonid Volkov for his expertise help with the confocal fluorescence microscopy. JEvL is the holder of the Jeanne and J.-Louis Lévesque Chair in radiobiology.*

RÉFÉRENCES

- ¹ Dougherty, T. J., Gomer, C. J., Henderson, B. W., Jori, G., Kessel, D. Korbélik, M., Moan J., and Peng, Q. (1988) Photodynamic therapy. *J. Natl. Cancer Inst.* 90, 889-905.
- ² MacDonald, I. J., and Dougherty, T. J. (2001) Basic principles of photodynamic therapy. *J. Porphyrins Phthalocyanines* 5, 105-129.
- ³ Fisher, A. M. R., Murphree, A. L., and Gomer, C. J. (1995) Clinical and preclinical photodynamic therapy. *Lasers Surg. Med.* 17, 2-31.

- ⁴ Henderson, B. W., and Dougherty, T. J. (1992) How does photodynamic therapy work? *Photochem. Photobiol.* 55, 145-157.
- ⁵ Hilf, R. Cellular targets of photodynamic therapy, *Photodynamic therapy. Basic Principles and Clinic Applications*. (Edited by Henderson, B. W., and Dougherty, T. J.), Marcel Dekker, New York, 1992, pp. 47-54.
- ⁶ Star, W. M., Marijnissen, P. A., van den Berg-Blok, A. E., Versteeg, J. A. C., Franken, K. A., and Reinhold, H. S. (1986) Destruction of rat mammary tumor and normal tissue microcirculation by hematoporphyrin derivative photoradiation observed in vivo in sandwich observation chambers. *Cancer Res.* 46 2532-2540.
- ⁷ Nelson, J. S., Liaw, L. H., Orenstein, A., Roberts, W. G., and Berns, M. W. (1988) Mechanism of tumor destruction following photodynamic therapy with hematoporphyrin derivative, chlorin, phthalocyanine. *J. Natl. Cancer Inst.* 80, 1599-1605.
- ⁸ Hamblin, M. R., and Newman, E. L. (1994) On the mechanism of tumor-localising effect in photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.* 23, 3-8.
- ⁹ Moan, J., and Peng, Q. (2003) An Outline of the Hundred-Year History of PDT. *Anti-cancer Research* 23, 3591-3600.
- ¹⁰ Bonnett, R. (1999) Photodynamic therapy in historical perspective. *Rev. Contemp. Pharmacother.* 10, 1-17.
- ¹¹ Ali, H., and van Lier, J.E. (1999) Metal complexes as photo- and radiosensitizers. *Chem. Rev.* 99, 2379-2450.
- ¹² Sharman, W. M., Allen, C. M., and van Lier, J. E. (1999) Photodynamic therapeutics: Basic principles and clinical applications. *Drug Discovery Today* 4, 507-517.

- ¹³ Allen, C. M., Sharman, W. M., and van Lier, J. E. (2001) Current status of phthalocyanines in the photodynamic therapy of cancer. *J. Porphyrines Phthalocyanines* 5, 161-169.
- ¹⁴ Ali, H., Langlois, R., Wagner, J. R., Brasseur, N., Paquette, B, van Lier, J. E. (1988) Biological activities of phthalocyanines-X. Syntheses and analyses of sulfonated phthalocyanines. *Photochem. Photobiol.* 47, 713-717.
- ¹⁵ Wagner, J. R., Ali, H., Langlois, R., Brasseur N., and van Lier, J. E. (1987) Biological activities of phthalocyanines VI. Photooxidation of L-tryptophan by selectively sulfonated gallium phthalocyanines: Singlet oxygen yields and effect of aggregation. *Photochem. Photobiol.* 45, 587-594.
- ¹⁶ Philips, D. (1997) Chemical mechanisms in photodynamic therapy with phthalocyanines. *Progress in Reaction Kinetics* 22, 175-300.
- ¹⁷ Kessel, D., Thompson, P., Saatio K., and Nantwi, K. D. (1987) Tumor localization and photosensitization by sulfonated derivatives of tetraphenylporphine. *Photochem. Photobiol.* 45, 787-790.
- ¹⁸ Kongshaug, M., Moan, J., and Brown S. B. (1989) The distribution of porphyrins with different tumor localizing ability among human plasma proteins. *Br. J. Cancer* 59, 184-188.
- ¹⁹ Woodburn, K., Stylli, S., Hill, J. S., Kaye, A. H., Reiss J. A., and Phillips, D. R. (1992) Evaluation of tumour and tissue distribution of porphyrins for use in photodynamic therapy. *Br. J. Cancer* 65, 321-328.

- ²⁰ Oleinick, N. L., Morris, R. L., and Belichenko, I. (2002) The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why and how. *Photochem. Photobiol. Sci. 1*, 1-21.
- ²¹ Ali, S. M., and Olivo, M. (2002) Bio-distribution and subcellular localization of Hypericin and its role in PDT induced apoptosis in cancer cells. *Int. J. Oncology 21*, 531-540.
- ²² Kessel, D., and Luo, Y. (2001) Intracellular sites of photodamage as a factor in apoptotic cell death. *J. Porphyrins Phthalocyanines 5*, 181-184.
- ²³ Ferri, K. F., and Kroemer, G. (2001) Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nature Cell Biology 3*, 255-263.
- ²⁴ Korbelick, M. and Cecic, I. (2003) Mechanism of Tumor Destruction by photodynamic therapy. In *Handbook of Photochemistry and Photobiology* (Edited by Nalwa, H. S.) American Scientific Publishers, Stevenson Ranch, CA. vol. 4, Chapter 2, pp. 39-77.
- ²⁵ Nonaka, M., Ikeda, H., and Inokuchi, T. (2004) Inhibitory effect of heat shock protein 70 on apoptosis induced by photodynamic therapy in vitro. *Photochem. Photobiol. 79*, 94-98.
- ²⁶ Margaron, P., Grégoire, M.-J., Scasnar, V., and van Lier, J. E. (1996) Structure-photodynamic activity relationships of a series of 4-substituted zinc phthalocyanines. *Photochem. Photobiol. 63*, 217-223.
- ²⁷ Paquette, B., Ali, H., Langlois, R., Brasseur, N., and van Lier, J. E. (1988) Biological activities of phthalocyanines-VIII. Cellular distribution in V-79 Chinese hamster cells and phototoxicity of selectively sulfonated aluminum phthalocyanines. *Photochem. Photobiol. 47*, 215-220.

- ²⁸ Brasseur, N., Ali, H., Langlois, R., and van Lier, J. E. (1988) Biological activities of phthalocyanine-IX. Photosensitization of V-79 Chinese hamster cells and EMT-6 mouse mammary tumor by selectively sulfonated zinc phthalocyanines. *Photochem. Photobiol.* 47, 705-711.
- ²⁹ Margaron, P., Madarnas, P., Ouellet, R., and van Lier, J. E. (1996) Biological activities of phthalocyanines-XVII. Histopathological evidence for different mechanisms of EMT-6 tumor necrosis induced by photodynamic thereapy with disulfonated aluminum phthalocyanine or photofrin. *Anticancer Res.* 16, 613-620.
- ³⁰ Chan, W.-S., Ali, H., and van Lier, J. E (1996) Evidence for different mechanisms of EMT-6 tumor necrosis by photodynamic therapy with disulfonated aluminum phthalocyanine or photofrin: Tumor cell survival and blood flow. *Anticancer Res.* 16, 1887-1892.
- ³¹ Paquette, B., Boyle, R. W., Ali, H., MacLennan, A. H., Truscott, T. G., and van Lier, J. E. (1991) Sulfonated phthalimidomethyl aluminum phthalocyanine: The effect of hydrophobic substituents on the in vitro phototoxicity of phthalocyanines. *Photochem. Photobiol.* 53, 323-327.
- ³² Kudrevich, S., Brasseur, N., La Madeleine, C., Gilbert, S., and van Lier, J. E. (1997) Syntheses and photodynamic activities of novel trisulfonated zinc phthalocyanine derivatives. *J. Med. Chem.* 40, 389-3904.
- ³³ Whoerle, D., Iskander, N., Grasclew, G., Sinn, H., Friedrich, E. A., Maier-Borst, W., Stern, J., and Schlag, P. (1990) Synthesis of positive charge phthalocyanines and their activity in the photodynamic therapy of cancer cells. *Photochem. Photobiol.* 51, 351-356.

- ³⁴ Zheng, G., Potter, W. R., Camacho, S. H., Missert, J. R., Wang, G., Bellnier, D. A., Henderson, B. W., Rodgers, M. A. J., Dougherty, T. J., and Pandey, R. K. (2001) Synthesis, photophysical properties, tumor uptake, and preliminary in vivo Photosensitizing efficacy of a homologous series of 3-(1'-Alkyloxy)ethyl-3-devinylpurpurin-18-N-alkylimides with variable lipophilicity. *J. Med. Chem.* 44, 1540-1559.
- ³⁵ Li, Z., van Lier, J. E., and Leznoff, C. C (1999) Heterocyclic aromatic amide protected groups for aryl and phthalocyaninesulfonic acids. *Can. J. Chem.* 77, 138-145.
- ³⁶ Sharman, W. M., and van Lier, J. E. (2000) The use of palladium catalysis in the synthesis of novel porphyrins and phthalocyanines. *J. Porphyrins Phthalocyanines* 4, 441-453.
- ³⁷ Tian, H., Ali, H., and van Lier, J. E. (2000) Synthesis of water soluble trisulfonated phthalocyanines via palladium-catalysed cross coupling reactions. *Tetrahedron Lett.* 41, 8435-8438.
- ³⁸ Langlois, R., Ali, H., Brasseur, N., Wagner, J. R., and van Lier, J. E. (1986) Biological activities of phthalocyanines-IV. Type II sensitized photooxidation of L-tryptophan and cholesterol by sulfonated metallophthalocyanines. *Photochem. Photobiol.* 44, 117-123.
- ³⁹ Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- ⁴⁰ Tada, H., Shiho, O., Kuroshima, K., Koyama, M., and Tsukamoto, K. (1986) An improved colorimetric assay for interleukin 2. *J. Immunol. Methods* 93, 157-165.
- ⁴¹ Bernauer, K., and Fallad, S. (1961) Phthalocyanine in wasseriger Losung I. *Helv. Chim. Acta* 44, 1287-1292.

- ⁴² Harriman, A., and Richoux, M.-C. (1980) Attempted photoproduction of hydrogen using sulfophthalocyanines as chromophores for three-component systems. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2*, 76, 1618-1626.
- ⁴³ Spike, J. D., and Bommer, J. C. (1986) Zinc phthalocyanine as a photodynamic sensitizer for biomolecules. *Int. J. Radiat. Biol.* 50, 41-45.
- ⁴⁴ Papoulis, A. Probability, Random Variables, and Stochastic Processes, 2nd ed. New York: McGraw-Hill, p. 104, 1984.
- ⁴⁵ Redmond, R. W., and Gamlin, J. N. (1999) A compilation of singlet oxygen yields from biologically relevant molecules. *Photochem. Photobiol.* 70, 391-475.
- ⁴⁶ van Lier, J. E. and Spikes, J. D. (1989) The chemistry, photophysics and photosensitizing properties of phthalocyanines. In *Photosensitizing Compounds: their chemistry, Biology and Clinical Use* (Edited by Dougherty, T. J., Bock, G. H., and Harnett, S.), Ciba Foundation Symposium 146, pp. 17-32. Wiley, Chichester.
- ⁴⁷ Brasseur, N., Ali, H., Langlois, R., and van Lier, J. E. (1987) Biological activities of phthalocyanine –VII. Photoinactivation of V-79 Chinese hamster cells by selectively sulfonated gallium phthalocyanines. *Photochem. Photobiol.* 46, 739-744.
- ⁴⁸ Brasseur, N., Ali, H., Langlois, R., Wagner, J. R., Rousseau, J., and van Lier, J. E. (1987) Biological activities of phthalocyanine –V. Photodynamic therapy of EMT-6 mammary tumors in mice with sulfonated phthalocyanines. *Photochem. Photobiol.* 45, 581-586.
- ⁴⁹ Chatelier, R. C, Sawyer, W. H., Swincer, A. G., and Ward, A. D. (1985) *Methods in porphyrin photosensitization* (Edited by Kessel, D.), p. 169. Plenum Press, New York.
- ⁵⁰ Rosenthal, I., Ben-Hur, E., Greenberg, S., Concepcion-Lam, A., Drew, D. M., and Leznoff, C. C. (1988) Substituted phthalocyanines as photodynamic sensitizers. In

Oxygen Radicals in Biology and Medicine (Edited by Simic, M. G., Taylor, K. A., Ward J. F., and von Sonntag, C.) Basic Life Science vol. 49, pp.467-472. Plenum Press, New York.

- ⁵¹ Brasseur, N., Nguyen, T.-L., Langlois, R., Ouellet, R., Marengo, S., Houde, D., and van Lier, J. E. (1994) Synthesis and photodynamic activities of silicon 2,3-naphthalocyanine derivatives. *J. Med. Chem.* 37, 415-420.

III DEUXIÈME ARTICLE

Photodynamic activity of substituted zinc trisulfophthalocyanines : role of plasma membrane damage. N. Cauchon, M. Nader, G. Bkaily, J.E. van Lier and D.J. Hunting, (2006) soumis à Photochemistry and photobiology.

III.1 Buts

Les résultats de notre premier article montrent un effet plus important des caractéristiques chimiques des PS sur leur activité photodynamique après un court temps d'incubation. Nous avons étudié l'importance de la sélectivité de la membrane plasmique pour l'incorporation cellulaire et comme cible principale lors de l'illumination.

III.2 Hypothèses

La perméabilité de la membrane plasmique contrôle le va-et-vient des molécules entre les compartiments intracellulaires et interstitiels. La structure chimique des PS influence la cinétique d'internalisation et la distribution à l'intérieur des couches lipidiques. La capacité des PS à traverser cette barrière détermine sa localisation et de sa concentration intramembranaire. Au moment de l'illumination, l'intensité des dommages induits à la membrane plasmique peut expliquer l'effet de la structure chimique sur l'activité photodynamique globale après un court temps d'incubation.

***PHOTODYNAMIC ACTIVITY OF SUBSTITUTED ZINC
TRISULFOPHTHALOCYANINES: ROLE OF PLASMA MEMBRANE DAMAGE***

**Nicole Cauchon,¹ Moni Nader,² Ghassan Bkaily,² Johan E. van Lier¹
and Darel Hunting^{1*}**

¹Department of Nuclear Medicine and Radiobiology,

² and Department of Anatomy and Cell Biology, Faculty of Medicine, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada J1H 5N4

* To whom correspondence should be addressed: Department of nuclear medicine and radiobiology, Faculty of Medicine, Université de Sherbrooke, 3001, 12th Avenue North, Sherbrooke, Québec, Canada J1H 5N4.
Tel: (819) 346-1110 ext: 14604; Fax: (819) 546-5442; e-mail: Darel.Hunting@USherbrooke.ca

ABSTRACT

We recently reported that variations in cellular phototoxicity among a series of alkynyl-substituted zinc trisulfophthalocyanines (ZnPcS_3C_n) correlates with their hydrophobicity with the most amphiphilic derivatives showing the highest cell uptake and phototoxicity. In this study we address the role of the plasma membrane in the photodynamic response as it relates to the overall hydrophobicity of the PS. The membrane tracker dye TMA-DPH was used to establish plasma membrane uptake by EMT-6 cells of the ZnPcS_3C_n by co-localization, while TMA-DPH membrane uptake rates after photodynamic therapy were used to quantify membrane permeability and damage. TMA-DPH co-localization patterns show membrane uptake of the PS after short 1-h incubation periods. TMA-DPH plasma membrane uptake rates after illumination of the dye-treated cells show a parabolic relationship with dye hydrophobicity that correlates well with the phototoxicity of the ZnPcS_3C_n . After a 1-h incubation period overall phototoxicity correlates closely with the TMA-DPH cell membrane uptake rate, suggesting a major role of plasma membrane damage in the overall PDT effect. In contrast, after a 24-h incubation, phototoxicity shows a stronger correlation with total cellular dye uptake rather than membrane uptake, suggesting a shift in the cellular damage responsible for photosensitization from the plasma membrane to intracellular targets. We conclude that membrane localization of the amphiphilic $\text{ZnPcS}_3\text{C}_6\text{-C}_9$ is a major factor in their overall photodynamic activity.

INTRODUCTION

Photodynamic therapy (PDT) is an alternative treatment for cancer and several other medical conditions requiring a PS, oxygen and light (1,2,3,4). Upon illumination of the affected area with light of the appropriate wavelength (630-800 nm) the PS is excited to its triplet state, which interacts with molecular oxygen to produce singlet oxygen and various other reactive oxygen species (ROS). The main cytotoxic entity is believed to be singlet oxygen, which acts at the site of the PS due to its very short half life (5). Depending on the distribution of the PS, tissue response may be induced either directly by cell inactivation (6,7) and/or indirectly by destruction of the vascular microcirculation (8,9,10).

The importance of lipophilicity vs. hydrophilicity for the photodynamic potency of the PS has been demonstrated in many studies (11,12,13). Amphiphilic (14) and hydrophobic PS with fewer than two negative charges can be internalized in cells by diffusion, passive partitioning between hydrophobic and hydrophilic environments of the cell membrane, endocytosis *via* association with LDL (15,16), pinocytosis after binding to BSA (17) or a combination of these processes. Hydrophilic PS, or hydrophobic PS with more than two negative charges, cannot diffuse across the plasma membrane; following non-covalent binding to serum proteins such as albumin and globulins they are transported by endocytosis only (1,18). In general, amphiphilic PS exhibit the highest *in vitro* and *in vivo* photodynamic activity (1,13,15,19,20).

We recently reported that variations in cellular phototoxicity among a series of trisulfonated zinc phthalocyanines (ZnPcS_3C_n) correlate with their amphiphilic properties, which facilitate cell uptake and intracellular localization at photosensitive sites (13). However, our data also indicated that the intracellular localization does not constitute the

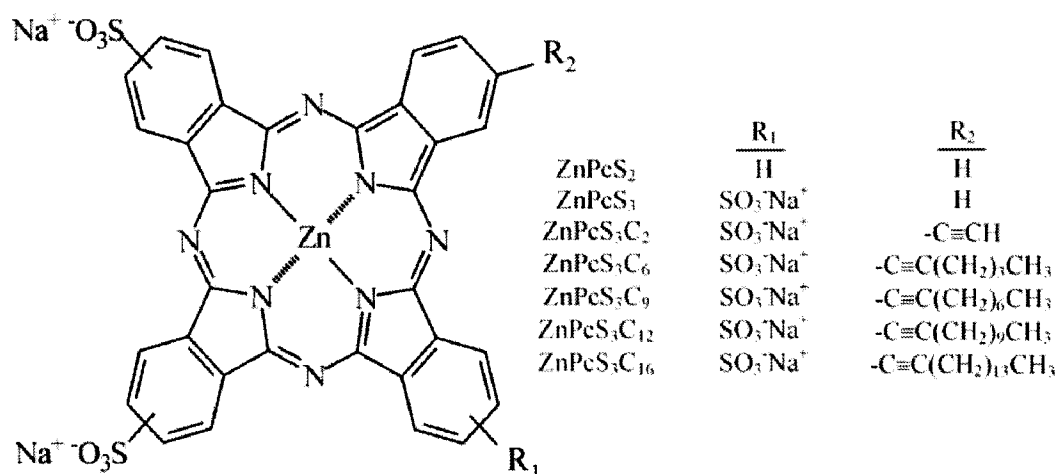
sole determining parameter in the overall photodynamic potency of the PS. Other factors, such as changes in membrane permeability and cell uptake kinetics, may play an equally important role. This was in particular suggested by the selective localization of the most amphiphilic dyes in the series (ZnPcS₃C₆₋₉) in the lysosomes and Golgi apparatus, which is indicative of an endocytic pathway. Such a pathway proceeds via initial, rapid membrane localization resulting in extensive plasma membrane damage after PDT at early incubation times. Several other classes of PS have been shown to target the plasma membrane during PDT (21,22,23).

The hydrophobic fluorescent bulk membrane probe 1-[4(trimethylamino)phenyl]-6-phenylhexa-1,3,5-triene (TMA-DPH), with its well documented properties, was used to visualize membrane internalization of a PS as well as plasma membrane damage after PDT (24,25,26). This cationic dye does not cross the intact cell membrane, but enters the membrane leaflets by endocytosis (27). TMA-DPH does not fluoresce in aqueous medium; however upon adhesion and internalization in the plasma membrane, its photophysical properties change due to interaction with the lipid environment, resulting in the emission of strong fluorescence after photo-activation (quantum yield 0.7). TMA-DPH is not cytotoxic, resists metabolic transformation, and the non-internalized fraction is easily removed from the membrane periphery by washing. As a result this fluorescent probe has been used extensively to evaluate plasma membrane fluidity and damage, as well as endocytosis and exocytosis.

Here, we use the TMA-DPH probe as an endocytic pathway marker, to reveal the presence and movement of PS in internal layers of the plasma membrane, and to estimate membrane photo-damage after PDT. In particular, we compare the effect of the structure

of a series of amphiphilic, sulfonated phthalocyanines (ZnPcS_3C_n) on their membrane internalization pattern and evaluate a possible correlation with the overall photodynamic potency of these PS.

MATERIAL AND METHODS



Scheme III.1: ZnPcS chemical structures

Photosensitizers. The di- and trisulfonated zinc(II) phthalocyanines (ZnPcS_2 and ZnPcS_3) were prepared via condensation of sulfonated precursors and purified by extensive C-18 reversed-phase HPLC as previously described (28). The ZnPcS_3C_n ($n=0-16$) (scheme III.1) were prepared as previously described and characterized by their characteristic UV-vis electronic spectra and HPLC retention times (t_R , weighted average of regional isomers) (13,29). To prepare the phosphate-buffered saline (PBS) solutions, ZnPcS were dissolved in PBS (pH 7.4) and sonicated for a few minutes. The solutions were filtered

(Millex-GV 0.22 μm , Millipore, Ont.) under sterile conditions and the ZnPcS concentrations were determined by UV-vis spectroscopy after a 50-fold dilution in methanol ($\epsilon=80.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ at 340 nm) and adjusted to 100 μM . The Soret band molar extinction coefficient is independent of solvent and therefore unaffected by aggregation, and remains unchanged within experimental error (30).

Cell culture. The cell line used was the EMT-6 murine mammary tumor line, maintained in Waymouth culture medium (Gibco, Burlington, Canada) supplemented with 15% fetal bovine serum (FBS), 1% glutamine and 1% pen-strep (Gibco).

ZnPcS cell uptake. EMT-6 cells (1.5×10^5 cells per well) in 1 mL Waymouth's medium were incubated in 24-multiwell plates (Falcon) overnight at 37°C under 5% CO_2 . The medium was removed; the monolayer rinsed twice with PBS and then overlaid with 500 μL of 1% FBS culture medium containing 1 μM of the ZnPcS. For the 24 h incubation period the medium was supplemented with 4% FBS to maintain cell viability. After the incubation period, the dye solution was removed; the cells were washed twice with PBS and then lysed with 500 μL of 0.1 N NaOH. An aliquot (50 μL) was removed to determine cellular protein according to the Bradford method (Bio-Rad Protein Assay) (31). DMF (450 μL) and PBS (100 μL) were added to the remaining cell lysate which was centrifuged for 30 min at 4°C, 3500 rpm and dye concentration in the clear supernatant was assayed by fluorescence spectroscopy (F-2000, Hitachi) ($\lambda_{\text{ex}} = 608 \text{ nm}$, 5 nm band pass, $\lambda_{\text{em}} = 687 \text{ nm}$, 5 nm band pass). Standard curves were made using cell lysates treated as

above with known amounts of the appropriate ZnPcS added. The results are expressed as nmole of ZnPcS per mg of cellular protein.

Membrane localization of ZnPcS. The cell suspension (1×10^5 cells/mL) was plated onto glass cover slips and incubated for 18-24 h at 37°C, 5% CO₂, to allow cell adhesion. The medium was removed; the attached cells were rinsed twice with PBS then overlaid with 1 mL of 1% FBS culture medium containing 1 μ M of the ZnPcS solution. After 1 or 24 h at 37°C, the cells were washed twice with PBS to remove the non-bound dye and then twice more with low phosphate buffer (HBSS/HEPES). The cells were mounted for direct microscopic observation at 28°C. Fluorescence images were taken 10 min after labeling the cells with TMA-DPH (2 μ M) in culture medium without phenol red. Cells were examined with a laser scanning confocal microscope coupled to an inverted microscope with a 60x differential interference contrast oil immersion objective lens (Nikon TE300 microscope with a Bio-Rad Radiance 2000 confocal accessory, Hertfordshire, UK). Specimens were excited by argon 363 nm UV laser light and emitted fluorescence was filtered using a barrier filter (460/40 nm band pass or 598/40 nm). Optical sections were collected at 0.5- μ m intervals with a 2.2 mm pinhole aperture (i.e. a minimal opening in order to yield a maximal confocal component). Digitized images of 512x512 pixels were obtained with a pixel size at 0.34 μ m. Laser line intensity, photometric gain, PMT sitting, and filter attenuation were kept constant throughout the experiments.

PDT of EMT-6 cells. Cell cultures were trypsinated to give a cell density of 1.5×10^5 cells/mL of which 100 μ L per well were plated in 96-multiwell plates and incubated over-

night at 37°C under 5% CO₂. One column of wells did not receive cells to serve as a blank. Attached cells were rinsed twice with PBS and incubated with 50 µL of the sulfonated ZnPcS solution (1 µM) in 1% FBS culture medium for 1 h or 24 h. One control column was filled with dye-free 1% FBS culture medium. The cells were then rinsed twice with PBS, refed with 100 µL of 15 % FBS culture medium and exposed for varying time intervals to red light (10 mW cm⁻² at 660-700 nm) delivered by two 500 W tungsten/halogen lamps fitted with a filter containing aqueous rhodamine B (O.D.₅₈₀ = 1.25) (20). Plates were incubated overnight at 37°C under 5% CO₂. Cell survival was measured by a colorimetric method, using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) (Sigma). Eight replicates were used and experiments were repeated at least three times. The MTT assay was adapted from the method described by Tada *et al.* (32). A stock solution of MTT in PBS (0.5% w/v) was prepared and kept at 4°C in the dark. The solution was diluted 5-fold in 15% FBS Waymouth and 50 µL was added to each well. After a 4 h incubation (37°C, 5% CO₂), 100 µL sodium dodecyl sulfate (10% in 0.01 N HCl) was added to the wells to stop MTT reduction and to dissolve the blue formazan crystals produced by mitochondrial hydrogenases in living cells. After a 24 h incubation, the optical densities at 570 nm were read on a microplate reader (Molecular Devices, Thermomax). The cell survival curves were plotted as a function of light dose and LD₉₀ values were calculated.

Effect of PDT on TMA-DPH cell membrane uptake kinetics. Cell cultures were trypsinated and diluted to 1.5×10⁵ cells/mL of which 100 µL per well were plated in 96-multiwell plates and incubated overnight at 37°C under 5% CO₂. One column of wells did

not receive cells to serve as a blank. Attached cells were rinsed twice with PBS and incubated with 50 μ L of various ZnPcS (1 μ M) in 1% FBS culture medium for 1 h or 24 h. One control column was filled with dye-free 1% FBS culture medium. The cells were then rinsed twice with PBS, refed with 50 μ L of culture medium without FBS and phenol red, and exposed for 0 min (control) or 5 min to red light (10 mW cm⁻² at 660-700 nm). Plates were incubated for 1 hour at 37°C under 5% CO₂. After incubation, the 96-multiwell plates were introduced in the microplate reader (BIO-TEK Instruments Inc., Winooski, VT) at 37°C, 50 μ l of TMA-DPH (2 μ M) in culture medium without FBS was added to each well and fluorescence intensities were measured over a period of 60 min, using a 20 watt tungsten quartz halogen bulb, an excitation light filter at 340/30 nm and an emission filter at 460/40 nm. The temperature was maintained at 37°C during the entire analysis. Eight replicates were used for each different experimental condition. The data were analyzed with KC4 software from Bio-Tek. To estimate the amount of TMA-DPH internalized in the membrane leaflets at the end of the incubation period, cells were washed six times (10 sec each) to remove the peripheral TMA-DPH followed by fluorescence measurements, as described above.

Effect of PDT on membrane permeability. Membrane permeability and apoptosis were measured using an apoptosis detection kit. A cell suspension (1 x 10⁵ cells/mL) was placed on glass cover slips and incubated for 18-24 h at 37°C, 5% CO₂ to allow for cell adhesion. The medium was removed; the attached cells were rinsed twice with PBS and then overlaid with 1 mL of 1% FBS culture medium containing 1 μ M of various ZnPcS solutions. After 1 or 24 h at 37°C, the cells were washed twice with PBS to remove excess

dye. The cells were refed with 1 mL of 15 % FBS culture medium and exposed to red light at the fluence (J cm^{-2}) required for 50% cell survival. Plates were incubated 4 h at 37°C under 5% CO_2 , and thereafter the medium was removed. The cells were washed twice with PBS and two more times with low phosphate buffer (HBSS/HEPES), incubated at 37°C under 5% CO_2 with biotinylated annexin-V (1 mL; component A of apoptosis assay kit V23200, diluted 667 times; Invitrogen Canada Inc., Burlington, ON, Canada) for 20 min, washed twice with HBSS/HEPES and incubated 30 min with Alexa-fluor 350 streptavidin (3 μg ; component B of kit V23200). Cells were washed twice with HBSS/HEPES, incubated for 5 min with propidium iodide (3 μg ; component C of kit V23200), washed twice PBS, blotted with absorbent paper and examined under a fluorescence microscope (Axioscop 2, Zeiss) fitted with two sets of filters ($\lambda_{\text{ex.}} = 365 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.}} = 420 \text{ nm}$ and $\lambda_{\text{ex.}} = 560/40 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.}} = 630/60 \text{ nm}$) (Chroma Technology Corp.). Alexa-fluor 350 streptavidin (apoptosis) is detected by its blue fluorescence and propidium iodide (loss of membrane permeability) by its red fluorescence. Photomicrographs were obtained using a digital camera (Empix Imaging).

Statistical analysis. Statistical computations were performed using GraphPad Prism, version 4.0 (GraphPad Software Inc. San Diego, CA). The mean value for the each assay was compared using one way analysis of variance (ANOVA). A probability value of $p = 0.05$ or less was considered statistically significant. Kinetic analysis and curves fitting were performed by Graph Pad Prism software with and without reduction of background.

RESULTS

ZnPcS₃C_n and TMA-PDH cell membrane co-localization

In order to determine the EMT-6 cell membrane uptake and distribution kinetics of our ZnPcS₃C_n, we followed both ZnPcS and TMA-DPH internalization by fluorescence microscopy. Figure III.1 shows the co-localization of TMA-DPH and different ZnPcS₃C_n (1 μ M) after 1 h (Panel A) and 24 h (Panel B) incubations. The presence of the ZnPcS is evident from their red fluorescence while TMA-DPH is detected by its green fluorescence. Co-localization results in the development of a yellow to orange color. The top row of each figure shows the internalization of the TMA-DPH endocytic marker alone as a function of incubation time (20 sec, 5 min and 10 min). Within 20 sec, peripheral labeling is evident while complete membrane internalization of the probe requires approximately 10 min. No dye uptake by the cell nucleus is noted.

After 1h incubation all ZnPcS, with the exception of the hydrophilic ZnPcS₃, co-localize with the endocytotic marker indicating their presence in the peripheral and internal membranes (Fig. III.1A). The pattern of co-localization varies with the hydrophobicity of the ZnPcS₃C_n; the latter being directly related to the length of the alkynyl side chain attached to the ZnPcS (13). In the case of the ZnPcS₃C₉ and ZnPcS₃C₁₆ we notice a granular, discontinuous staining while in the case of the ZnPcS₃C₆ and ZnPcS₂ a more diffuse localization pattern is evident. After this short incubation period, ZnPcS₃ and ZnPcS₃C₁₆ reduce the internalization rate of the TMA-DPH such that after 10 min incubation the probe is still mainly localized at the peripheral region of the cell.

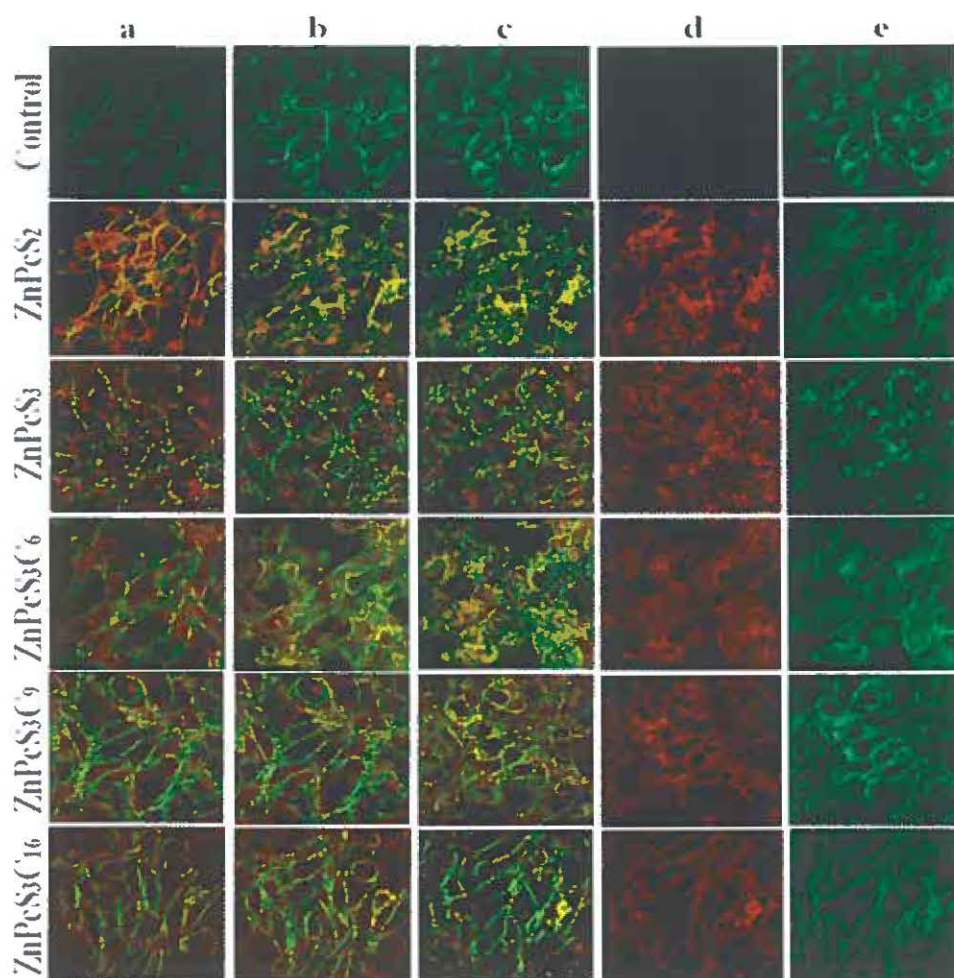


Figure III.1 A: Internalization of TMA-DPH by EMT-6 cells. Adhered EMT-6 cells on glass cover slips were incubated 1h with a series of ZnPcS. After removing the dye, the cells were stained with TMA-DPH (1 μ M) and fluorescent images were taken after 20 sec (column A), 5 min (column B) and 10 min (column C). All confocal microscopy parameters were kept constant throughout the experiment. For each row, the fluorescence images depict the same area on the slide. Co-localization of TMA-DPH and ZnPcS results in a yellow color. Two last columns show the ZnPcS alone (column D) and TMA-DPH alone (column E) after a 10 min incubation.

In contrast, following 24 h incubation, less co-localization with TMA-DPH is observed for all ZnPcS studied; 20 sec after addition of the probe only small, random dispersed co-localization spots are visible (Fig. III.1B). Only the ZnPcS₂ is visible inside the membrane leaflet while none of the other ZnPcS₃C_n co-localize with the probe. Thus,

longer incubation periods with ZnPcS do not appear to affect the TMA-DPH internalization process.

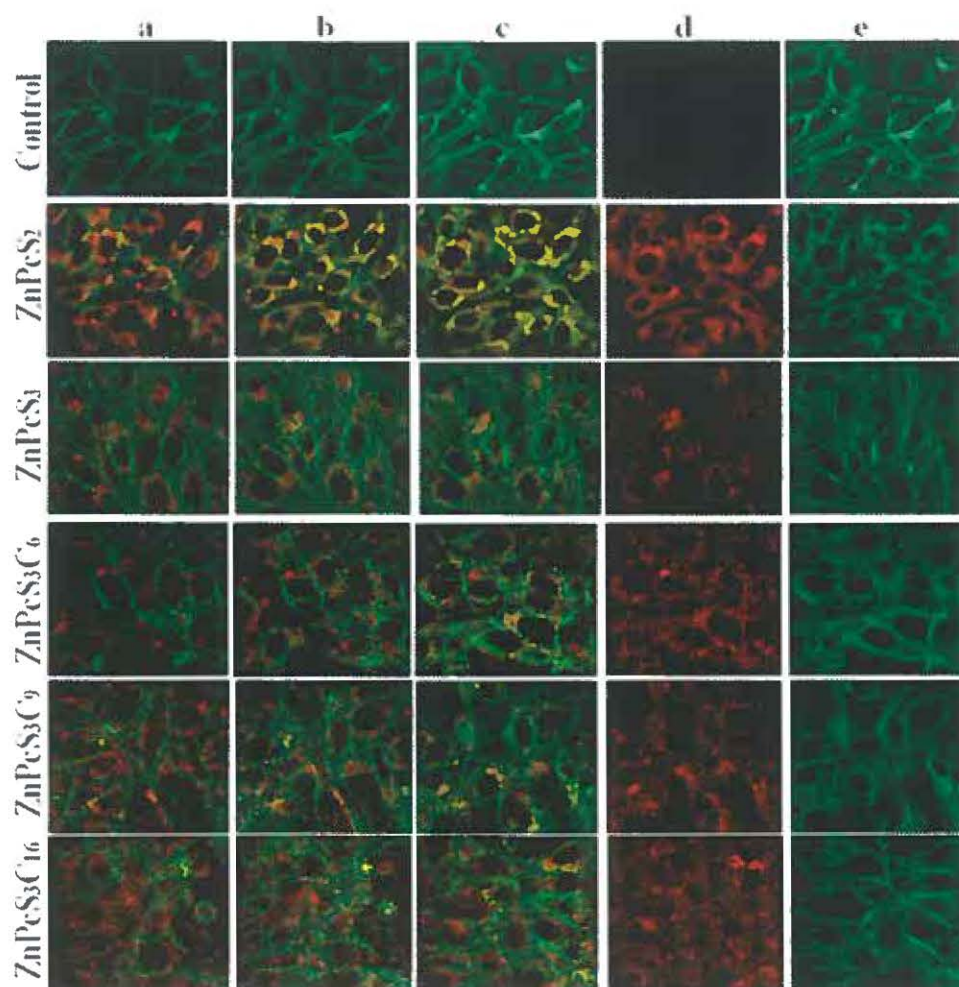


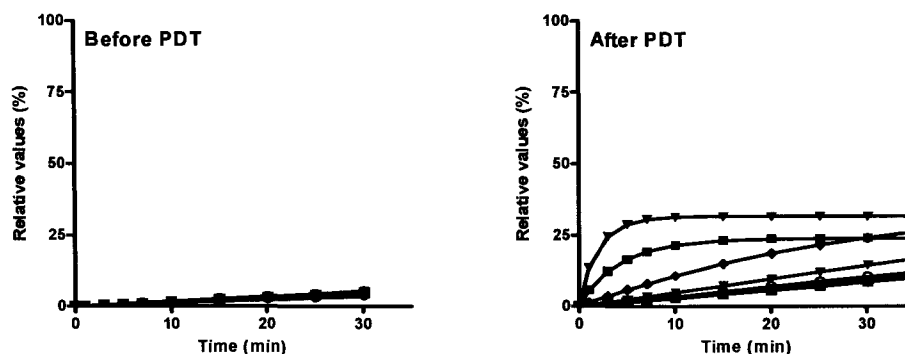
Figure III.1 B: Internalization of TMA-DPH by EMT-6 cells. Adhered EMT-6 cells on glass cover slips were incubated 24 h with a series of ZnPcS. After removing the dye, the cells were stained with TMA-DPH (1 μ M) and fluorescent images were taken after 20 sec (column A), 5 min (column B) and 10 min (column C). All confocal microscopy parameters were kept constant throughout the experiment. For each row, the fluorescence images depict the same area on the slide. Co-localization of TMA-DPH and ZnPcS results in a yellow color. Two last columns show the ZnPcS alone (column D) and TMA-DPH alone (column E) after 10 min incubation.

TMA-DPH internalization kinetics

To evaluate PDT-induced photodamage at the cell membrane level, EMT-6 cell permeability was assessed from the TMA-DPH membrane uptake kinetics. Initial uptake rates were determined from the fluorescence intensity (FI) values measured before and after PDT, following 1-h or 24-h incubation periods with the ZnPcS (Fig. III.2 and III.3). No dark toxicity was observed with any of the ZnPcS ($<100 \mu\text{M}$) under these experimental conditions.

Fig. III.2 shows the TMA-DPH total cell uptake curves following ZnPcS incubation times of 1-h (A) and 24-h (B). The left graphs present TMA-DPH uptake before PDT, the right graphs after PDT. After the ZnPcS incubation and prior to PDT, all cell uptake progresses linearly. The presence of the different ZnPcS does not modify significantly the TMA-DPH uptake kinetics. After PDT, following a 1 h incubation with ZnPcS₂ or ZnPcS₃C₉, the TMA-DPH uptake curves change to a tri-phase pattern, of which the first phase is very rapid followed by a slower phase that eventually attains a plateau while the remaining ZnPcS induce a linear increase in the cellular probe concentration (Fig. III.2 A, right plot). After an extended incubation (24 h) with ZnPcS, the three-phase TMA-DPH uptake curves and initial uptake rates are similar for all ZnPcS tested (Fig. III.2 B, right plot). It is evident from these graphs that PDT of EMT-6 cells, depending on the type of ZnPcS₃C_n used, significantly affects cell membrane function.

A : 1 h incubation with ZnPcS



B: 24 h incubation with ZnPcS

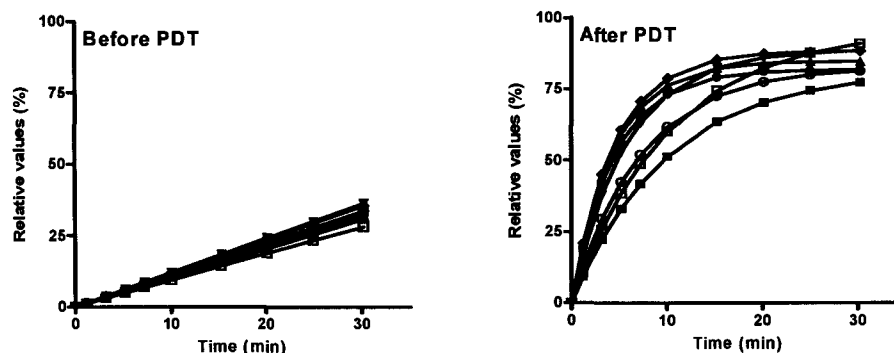
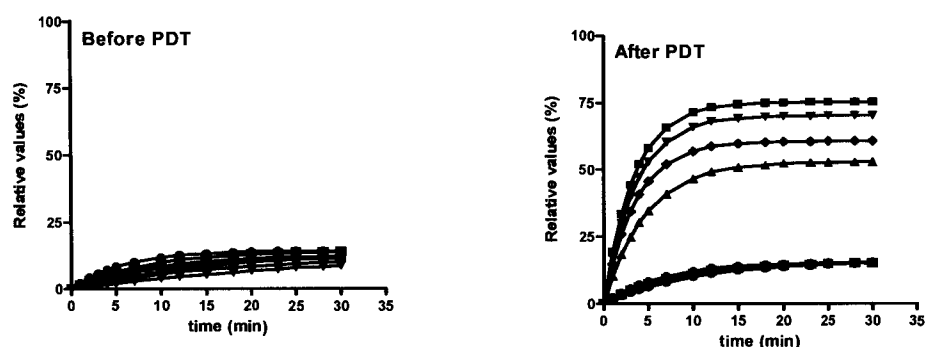


Figure III.2: TMA-DPH relative fluorescence intensity in EMT-6 cells after 1 h (A) or 24 h incubation (B) with ZnPcS₂ (—■—), ZnPcS₃ (—●—), ZnPcS₃C₂ (—□—), ZnPcS₃C₆ (—▲—), ZnPcS₃C₉ (—▼—), ZnPcS₃C₁₂ (—◇—) and ZnPcS₃C₁₆ (—○—) as a function of time. Points represent the mean of 8 replicates and curves were fitted using Graph Prism software. The left plots show data before PDT, the right after PDT (3 J cm⁻²; 100 mW cm⁻²).

Fig. III.3 represents TMA-DPH membrane uptake only, i.e. after washing the cells to remove peripheral TMA-DPH. PDT after a 1-h incubation with the amphiphilic ZnPcS₂, ZnPcS₃C₆, ZnPcS₃C₉ or ZnPcS₃C₁₂ augments the initial probe uptake rates as well as the maximum uptake values (Fig. III.3A, right plot). Three-phase uptake curves are obtained featuring an initial rapid phase (5-10 min) followed by a slower linear increase,

finally attaining a maximum probe concentration after 10-20 min. In contrast, ZnPcS_3 -, ZnPcS_3C_2 - or $\text{ZnPcS}_3\text{C}_{16}$ -PDT does not affect the probe uptake pattern (Fig. 3A, right plot). PDT after 24 h incubation with the ZnPcS results in a slower initial TMA-DPH uptake rate as compared to that observed after 1h incubation; $\text{ZnPcS}_3\text{C}_{16}$ -PDT now also provokes a significant increase in TMA-DPH uptake (Fig. III.3B, right plot). The rates and the maximal probe concentrations attained vary with the hydrophobicity of the PS but differences are less pronounced as compared to those observed after the 1-h incubation period.

A : 1 h incubation with ZnPcS



B: 24 h incubation with ZnPcS

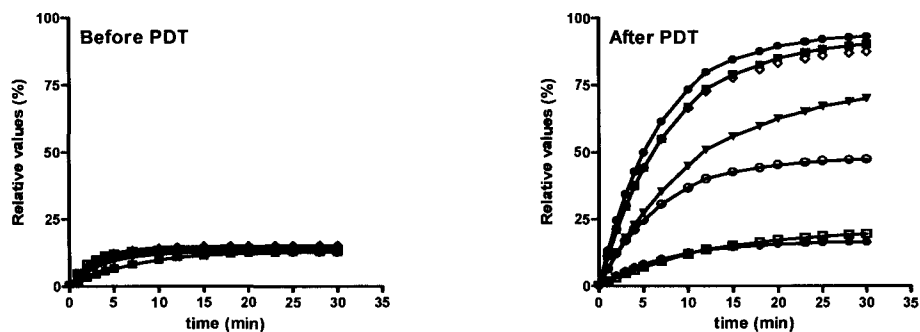


Figure III.3: TMA-DPH relative fluorescence intensity in EMT-6 cells after 1 h (A) or 24 h incubations (B) with ZnPcS₂ (—■—), ZnPcS₃ (—●—), ZnPcS₃C₂ (—□—), ZnPcS₃C₆ (—▲—), ZnPcS₃C₉ (—▼—), ZnPcS₃C₁₂ (—◇—) and ZnPcS₃C₁₆ (—○—) as a function of time. Points represent the mean of 8 replicates and curves were fitted using Graph Prism software. The left plots show data before PDT, the right after PDT (3 J cm⁻²; 100 mW cm⁻²).

Table III.1 summarizes ZnPcS cell uptake, cell phototoxicity (expressed as cells killed/photon absorbed) and the TMA-DPH membrane uptake rates (measure of membrane permeability), after 1 h and 24 h incubation periods with 1 μ M of the various ZnPcS. Table III.1 also lists the reversed-phase HPLC retention times, which have previously been shown to correlate well with the octanol/water partition coefficient and thus can be viewed as a measure of the relative hydrophobicity of the ZnPcS (13).

Table III.1: Effect of ZnPcS structural modifications on EMT-6 cell uptake, phototoxicity and membrane permeability after PDT

ZnPcS	$t_R^{(a)}$ (min)	1 h incubation			24 h incubation		
		ZnPcS	Cells	TMA-DPH	ZnPcS	Cells	TMA-DPH
		Relative values (%) ^(e)			Relative values (%) ^(e)		
ZnPcS ₂	25.5	4.8 \pm 1.7	57.8	82.7 \pm 0.1	50.8 \pm 0.8	69.1	52.0 \pm 0.6
ZnPcS ₃	22.4	2.3 \pm 0.7	10.0	10.2 \pm 0.1	28.3 \pm 1.1	68.4	9.7 \pm 0.1
ZnPcS ₃ C ₂	23.4	2.5 \pm 0.3	24.5	8.6 \pm 0.9	55.3 \pm 1.7	72.0	8.0 \pm 0.1
ZnPcS ₃ C ₆	27.2	14.8 \pm 1.6	67.1	45.3 \pm 2.0	73.6 \pm 2.3	69.8	30.9 \pm 0.3
ZnPcS ₃ C ₉	28.8	18.7 \pm 0.9	72.7	74.3 \pm 1.7	84.9 \pm 3.9	71.4	60.7 \pm 0.8
ZnPcS ₃ C ₁₂	29.9	10.8 \pm 0.5	63.1	64.1 \pm 0.1	48.8 \pm 2.3	69.4	52.8 \pm 0.7
ZnPcS ₃ C ₁₆	31.3	2.3 \pm 0.7	0.1	7.1 \pm 0.1	46.3 \pm 3.5	64.9	29.8 \pm 0.4

^(a) Retention time (t_R) on a C-18 reversed-phase HPLC column. ^(b) ZnPcS (1 μ M) cell uptake (\pm SEM) after 1 h or 24 h incubation. ^(c) The phototoxicity/photoefficiency was calculated based on cell uptake of each ZnPcS and the cell killing after 5 min of illumination LD₉₀ and expressed as killed cells/photon absorbed with ZnPcS (1 μ M) for 1 h or 24 h. ^(d) Membrane permeability after PDT expressed as initial TMA-DPH internalization rate, measured from the fluorescence intensity (Δ FI \pm SEM) as a function of time. ^(e) To facilitate detection of potential structure-activity relationships, in vitro parameters of this table are expressed as % of their maximal values and plotted as a function of the HPLC retention times (Fig. III.5A and III.5B)

Effect of PDT on membrane permeability

To visualize plasma membrane damage after PDT we exposed cells for 5 min to the red-fluorescent propidium iodide (PI) dye that is part of the Vybrant® Apoptosis Assay Kit (Molecular Probes). This kit also contains a blue-fluorescent streptavidin that conjugates strongly with biotinylated annexin V, which detects exposed PSer, i.e. the molecular marker on apoptotic cells. Slow PI uptake distinguishes viable and apoptotic from necrotic cells based on the integrity of the plasma membrane. Fig. III.4 depicts a series of representative images obtained after PDT with the various ZnPcS, revealing significant differences in plasma membrane damage.

Thus PDT, after a 1 h incubation with ZnPcS₂ (e), ZnPcS₃C₆ (d), -C₉ (f) or -C₁₂ (g) induces both membrane permeability (red fluorescence) and apoptosis (blue fluorescence), while ZnPcS₃ (b), ZnPcS₃C₂ (c) and -C₁₆ (h) induce apoptosis only, without detectable loss of membrane integrity. Control cells do not show either red or blue fluorescence confirming membrane integrity. After a 24 h incubation with the ZnPcS all cells showed extensive plasma membrane damage as evidenced by uptake of both fluorescence probes. These observations are in accord with the TMA-DPH cell membrane uptake kinetics, where the most active ZnPcS in the series show a strong increase in TMA-DPH uptake rates after similar PDT treatment (Fig. III.3).

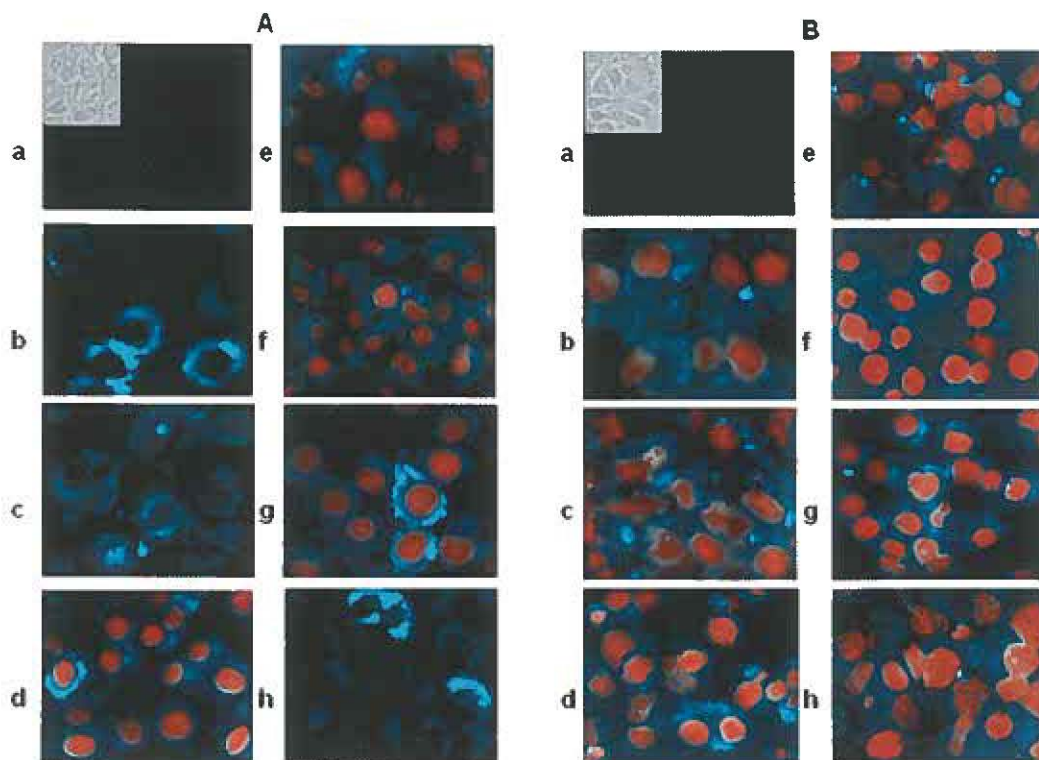


Figure III.4: Detection of apoptosis and membrane permeability in EMT-6 cells. Adhered EMT-6 cells on glass cover slips were incubated 1h (A) and 24 h (B) with a series of ZnPcS. After and before PDT, the apoptotic cells were stained with biotinylated anx V, and Alexa Fluor 350 SA_v was added to label bound anxV (blue fluorescence). Propidium iodide (PI) was subsequently added to detect membrane permeability (red fluorescence). Control (a), ZnPcS₃ (b), ZnPcS₃C₂ (c), ZnPcS₃C₆ (d), ZnPcS₂ (e), ZnPcS₃C₉ (f), ZnPcS₃C₁₂ (g), and ZnPcS₃C₁₆ (h).

DISCUSSION

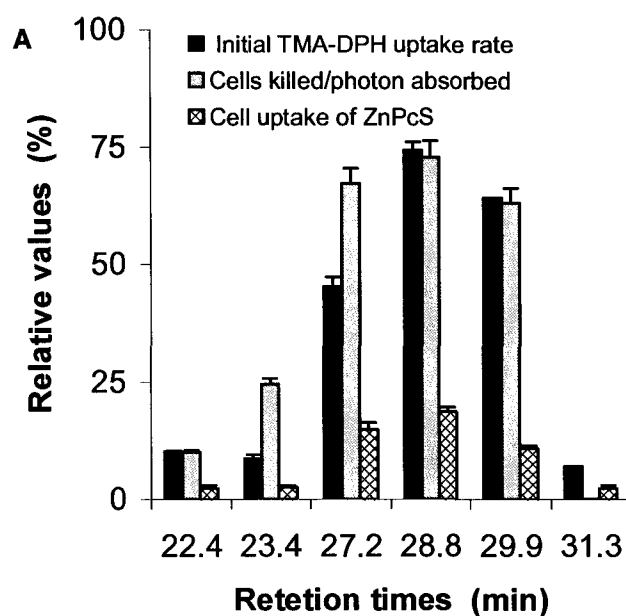
We previously showed that the photodynamic potential of a series of ZnPcS₃C_n follows a parabolic relationship with an increase in hydrophobicity such that amphiphilic derivatives featuring a short, lipophilic side chain (n=6-9) are the most phototoxic. Removing the side chain (n=0) or shortening its length to an alkynyl group only (n=2) gave a more hydrophilic, less phototoxic drug, while extending the side chain (n=12-16) gave a more hydrophobic, but likewise less phototoxic drug. Thus an inverse parabolic relation-

ship was observed between hydrophobicity and cell uptake. The most active derivatives, i.e. ZnPcS₃C₆ and ZnPcS₃C₉, mainly localize in the mitochondria and Golgi apparatus suggesting that the overall phototoxicity of the drugs largely depends on their capacity to cross the cell membrane and to localize at photo-sensitive organelles within the cells. However, in view of the large differences in structure-activity relationships after the 1-h versus the 24-h incubation periods, we concluded that other factors such as cell uptake kinetics and changes in permeability of the various membrane structures, may contribute to the overall cellular phototoxicity of the ZnPcS.

In this study we address the role of the plasma membrane in the photodynamic response as it relates to drug uptake, PDT-induced plasma membrane damage and hydrophobicity of the PS. It has been demonstrated that plasma membrane damage causes varying degrees of depletion of intracellular ATP, inducing both necrosis and apoptosis resulting in rapid cell death (23,33,34). Previous studies using fluorescence microscopy with TMA-DPH and different PS such as etiopurpurin, photofrin, merocyanine 540 and dendrimer porphyrins have indicated that the membrane constitutes a major target for PDT (21,35,36).

Plasma membrane uptake of the red-fluorescing ZnPcS can be evaluated qualitatively by co-localization with the green-fluorescing TMA-DPH tracker dye. Although variations in co-localization as a function of the ZnPcS hydrophobicity are evident (Fig. III.1), such data are difficult to quantify in order to arrive at structure-activity relationships. The propidium iodide staining assays confirm that the more amphiphilic ZnPcS are the most phototoxic and capable of rapidly inducing plasma membrane damage (Fig. III.4). To quantify PDT-induced plasma membrane damage we used the TMA-DPH

plasma membrane uptake rate as a parameter (Fig. III.2 and III.3). In view of the very short action range of cytotoxic singlet oxygen generated during PDT we may assume that any increase in the TMA-DPH uptake rate after PDT correlates both with plasma membrane damage and ZnPcS internalization. Initial TMA-PDH uptake rates derived from the uptake curves can now be correlated with overall phototoxicity and physical-chemical parameters (HPLC retention times) to investigate possible quantitative structure-activity relationships (Table III.1). To facilitate detection of potential structure-activity relationships, in vitro parameters are expressed as % of their maximal values and plotted as a function of the HPLC retention times (Fig. 111.5A and 111.5B).



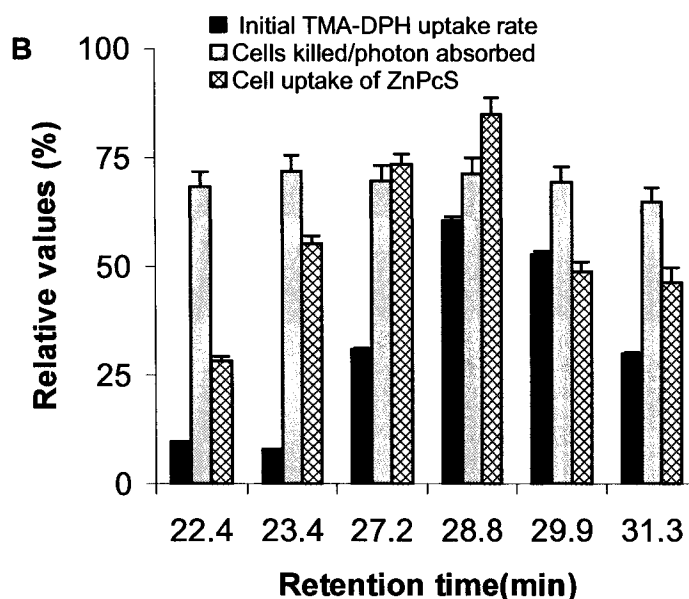


Figure III.5: EMT-6 cell phototoxicity after PDT, TMA-DPH uptake rate after PDT and ZnPcS cell uptake before PDT, after 1 h (A) and 24 h (B) incubation periods with a series of ZnPcS as a function of relative hydrophobicity (HPLC retention time). Values are taken from Table III.1 and standardized as % of the highest value of each parameter observed for both incubation times.

The histograms show a clear structure-activity relationship between ZnPcS hydrophobicity (t_R), ZnPcS cell uptake, phototoxicity and PDT-induced membrane permeability (i.e. the initial TMA-DPH membrane uptake rate). In particular, for the 1-h incubation period overall phototoxicity correlates more closely with the TMA-DPH uptake rate than with total ZnPcS cell uptake, suggesting a major role of plasma membrane damage in the overall PDT effect (Fig. III.5A). After a 24-h incubation period, we observe an increase in cell uptake of all ZnPcS that correlates well with their increased overall phototoxicity, suggesting a shift in the photo-damage from the membrane to intracellular targets (Fig. III.5B). The significant increase in ZnPcS₃C₆/C₉ cell uptake after a 24 h incubation is not paralleled by a proportional increase in phototoxicity, suggesting that their internalization does not contribute to the augmented phototoxicity. Consequently membrane localization

and subsequent damage induced by these amphiphilic PS is a major factor in exerting their overall photodynamic activity. Our findings are in agreement with a recent report by Fabris et al. (34) indicating that the outcome of in vitro photosensitization with non-substituted ZnPc could be modulated from a necrotic (plasma membrane damage) to an apoptotic (intracellular damage) response pathway by shortening the incubation period.

CONCLUSION

Co-localization of the fluorescence membrane probe TMA-DPH and a series of substituted trisulfonated ZnPcS_3C_n revealed a relationship between the hydrophobicity of the PS and the tendency to localize in the plasma membrane. After short incubation times and the illumination with red light, amphiphilic ZnPcS target cellular plasma membrane structures, triggering extensive plasma membrane damage and cell death via necrosis while the most hydrophilic and hydrophobic virtually have no significant effect. After longer incubation times all ZnPcS migrate to the intracellular compartment, which upon light exposure induces cell death mainly via an apoptotic pathway. Thus our data demonstrate that PDT induced cell death can be modulated both by the choice of PS and timing between drug and light application. These findings expand on our previously reported activity relationships of the same series of ZnPcS where we showed that amphiphilic properties play a key role in promoting cell uptake and photocytotoxicity. Our data confirm that introducing a lipophilic C6-C9 alkynyl chain to a trisulfonated ZnPc macrocycle greatly augments its potential as a PS for PDT.

ACKNOWLEDGMENT: This work was supported by the Canadian Institutes for Health Research (CIHR grant MOP-37768). The authors are grateful to Dr. Leonid Volkov for their expertise and help with the fluorescence microscopy.

REFERENCES

1. Castano, A.P., T. N. Demidova and M. R. Hamblin (2004) Mechanisms in photodynamic therapy: part one photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis Photodynamic Ther.* **1**, 279-293.
2. Dougherty, T. J., C. J. Gomer, B. W. Henderson, G. Jori, D. Kessel, M. Korbely, J. Moan and Q. Peng (1988) Photodynamic therapy. *J. Natl. Cancer Inst.* **90**, 889-905.
3. MacDonald, I. J. and T. J. Dougherty (2001) Basic principles of photodynamic therapy. *J. Porphyrins Phthalocyanines* **5**, 105-129.
4. Fisher, A. M. R., A. L. Murphree and C. J. Gomer (1995) Clinical and preclinical photodynamic therapy. *Lasers Surg. Med.* **17**, 2-31.
5. Oleinick, N. L., R. L. Morris and I. Belichenko (2002) The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why and how. *Photochem. Photobiol. Sci.* **1**, 1-21.
6. Henderson, B. W. and T. J. Dougherty (1992) How does photodynamic therapy work? *Photochem. Photobiol.* **55**, 145-157.
7. Hilf, R. (1992) Cellular targets of photodynamic therapy. In *Photodynamic therapy. Basic Principles and Clinic Applications*. (Edited by B. W. Henderson and T. J. Dougherty), pp. 47-54. Marcel Dekker, New York.

8. Star, W. M., P. A. Marijnissen, A. E. van den Berg-Blok, J. A. C. Versteeg, K. A. Franken and H. S. Reinhold (1986) Destruction of rat mammary tumor and normal tissue microcirculation by hematoporphyrin derivative photoradiation observed in vivo in sandwich observation chambers. *Cancer Res.* **46**, 2532-2540.
9. Nelson, J. S., L. H. Liaw, A. Orenstein, W. G. Roberts and M. W. Berns (1988) Mechanism of tumor destruction following photodynamic therapy with hematoporphyrin derivative, chlorin, phthalocyanine. *J. Natl. Cancer Inst.* **80**, 1599-1605.
10. Hamblin, M. R. and E. L. Newman (1994) On the mechanism of tumor-localising effect in photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.* **23**, 3-8.
11. Zheng G., W. R. Potter, S. H. Camacho, J. R. Missert, G. Wang, D. A. Bellnier, B. W. Henderson, M. A. Rodgers, T. J. Dougherty and R. K. Pandey (2001) Synthesis, photophysical properties, tumor uptake, and preliminary in vivo photosensitizing efficacy of a homologous series of 3-(1'-alkyloxy)ethyl-3-devinylpurpurin-18-N-alkylimides with variable lipophilicity. *J. Med. Chem.* **44**, 1540-1559.
12. You Y., S. L. Gibson, R. Hilf, S. R. Davies, A. R. Oseroff, I. Roy, T. Y. Ohulchanskyy, E. J. Bergey and M. R. Detty (2003) Water soluble, core-modified porphyrins. 3. Synthesis, photophysical properties, and in vitro studies of photosensitization, uptake, and localization with carboxylic acid-substituted derivatives. *J. Med. Chem.* **46**, 3734-3747.
13. Cauchon N., H. Tian, R. Langlois, C. La Madeleine, S. Martin, H. Ali, D. J. Hunting and J. E. van Lier (2005) Structure-photodynamic activity relationships of substituted zinc trisulfophthalocyanines. *Bioconjugate Chem.* **16**, 80-89.

14. Chatelier R. C., W. H. Sawyer, A. G. Swincer and A. D. Ward (1985) Porphyrin-membrane interactions: structural, kinetic and thermodynamic aspects studied using fluorescence techniques. *Adv. Exp. Med. Biol.* **193**, 169-180.
15. Paquette, B., H. Ali, R.Langlois, N.Brasseur, and J. E. van Lier (1988) Biological activities of phthalocyanines-VIII. Cellular distribution in V-79 Chinese hamster cells and phototoxicity of selectively sulfonated aluminum phthalocyanines. *Photochem. Photobiol.* **47**, 215-220.
16. Kessel, D., P. Thompson, K. Saatio and K. D. Nantwi (1987) Tumor localization and photosensitization by sulfonated derivatives of tetraphenylporphine. *Photochem. Photobiol.* **45**, 787-790.
17. Sharman W.M., van Lier J.E., Allen C.M. (2004) Targeted photodynamic therapy via receptor mediated delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev.* **56**, 53-76.
18. Siboni G., H. Weitman, D. Freeman, Y. Mazur, Z. Malik and B. Ehrenberg (2002) The correlation between hydrophilicity of hypericins and helianthrone: internalization mechanisms, subcellular distribution and photodynamic action in colon carcinoma cells. *Photochem. Photobiol. Sci.* **1**, 483-491.
19. Brasseur, N. H. Ali, R. Langlois and J.E. van Lier (1988) Biological activities of phthalocyanines IX. Photosensitization of V-79 Chinese hamster cells and EMT-6 mouse mammary tumor by selectively sulfonated zinc phthalocyanines. *Photochem. Photobiol.* **47**, 705-713.
20. Allen C.M., R. Langlois, W.M. Sharman, C. La Madeleine and J.E. van Lier (2002) Photodynamic properties of amphiphilic derivatives of aluminum tetrasulfophthalocyanine. *Photochem. Photobiol.* **76**, 208-216.

21. Nishiyama N., H. R. Stapert, G. D. Zhang, D. Takasu, D. L. Jiang, T. Nagano, T. Aida and K. Kataoka (2003) Light-harvesting ionic dendrimer porphyrins as new photosensitizers for photodynamic therapy. *Bioconjugate Chem.* **14**, 58-66.
22. Ali, S. M. and M. Olivo (2002) Bio-distribution and subcellular localization of Hypericin and its role in PDT induced apoptosis in cancer cells. *Int. J. Oncology* **21**, 531-540.
23. Hsieh Y.J., C. C. Wu, C. J. Chang and J. S. Yu (2003) Subcellular localization of Photofrin determines the death phenotype of human epidermoid carcinoma A431 cells triggered by photodynamic therapy: when plasma membranes are the main targets. *J. Cell Physiol.* **194**, 363-375.
24. Illinger D. and J. G. Kuhry (1994) The kinetic aspects of intracellular fluorescence labeling with TMA-DPH support the maturation model for endocytosis in L929 cells. *J. Cell Biol.* **125**, 783-794.
25. Cupers P., A. Veithen, A. Kiss, P. Baudhuin and P. J. Courtoy (1994) Clathrin polymerization is not required for bulk-phase endocytosis in rat fetal fibroblasts. *J. Cell Biol.* **127**, 725-735.
26. Illinger D., G. Duportail, Y. Mely, N. Poiriel-Morales, D. Gerard and J. G. Kuhry (1995) A comparison of the fluorescence properties of TMA-DPH as a probe for plasma membrane and for endocytic membrane. *Biochim. Biophys. Acta.* **1239**, 58-66.
27. Illinger D., P. Poidron, P. Fonteneau, M. Modollel and J. G. Kuhry (1990) Internalization of the lipophilic fluorescent probe trimethylamino-diphenylhexatriene follows the endocytosis and recycling of the plasma membrane in cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1030**, 73-81.

28. Ali H., R. Langlois, J. R. Wagner, N. Brasseur, B. Paquette and J. E. van Lier (1987) Biological activities of phthalocyanines X. Synthesis and analysis of sulfonated phthalocyanines. *Photochem. Photobiol.* **47**, 713-717.
29. Tian H., H. Ali and J. E. van Lier (2000) Synthesis of water soluble trisulfonated phthalocyanines via palladium-catalysed cross coupling reactions. *Tetrahedron Lett.* **41**, 8435-8438.
30. Philips D. (1997) Chemical mechanisms in photodynamic therapy with phthalocyanines. *Progress in Reaction Kinetics* **22**, 175-300.
31. Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
32. Tada H., O. Shiho, K. Kuroshima, M. Koyama and K. Tsukamoto (1986) An improved colorimetric assay for interleukin 2. *J. Immunol. Methods* **93**, 157-165.
33. Dellinger M. (1996) Apoptosis or necrosis following Photofrin® photosensitization: influence of the incubation protocol. *Photochem. Photobiol.* **64**, 182-187.
34. Fabris C., G. Valduga, G. Miotto, L. Borsetto, G. Jori, S. Garbisa and E. Reddi (2001) Photosensitization with zinc (II) phthalocyanine as a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *Cancer Res.* **61**, 7495-500.
35. Kessel D., Y. Luo, Y. Deng and C. K. Chang (1997) The role of subcellular localization in initiation of apoptosis by photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* **65**, 422-426.

- ³⁶. Sharma M., P. G. Joshi and N. B. Joshi (1997) Alterations in plasma membrane of glioblastoma cells by photodynamic action of merocyanine 540. *Biochim. Biophys. Acta* **1323**, 272-280.

IV TROISIÈME ARTICLE

PET Imaging of Apoptosis with ^{64}Cu -Labelled Streptavidin following Pretargeting of Phosphatidylserine with Biotinylated Annexin-V. N. Cauchon, R. Langlois, J. A. Rousseau, G. Tessier, J. Cadorette, R. Lecomte, D. J. Hunting, R. A. Pavan, S. K. Zeisler, J. E. van Lier, (2006). Accepté dans European journal of nuclear medicine and molecular imaging.

IV.1 Buts

L'objectif du troisième article était de synthétiser un dérivé radioactif combinant l'annexine-V et un isotope du cuivre et de développer une méthode indirecte non invasive et flexible pour la détection de l'apoptose par TEP.

IV.2 Hypothèses

- a) La détection *in vivo* de l'apoptose sera effectuée par un dérivé radioactif de l'annexine-V en raison de sa grande affinité pour la Pser, un trait caractéristique du début de la phase exécutrice de l'apoptose qui persiste jusqu'à la dégradation finale de la cellule.
- b) Le cuivre-64 ($t_{1/2} = 12,7$ h) est un émetteur de positrons produit dans un cyclotron médical et facilement incorporé dans une protéine grâce à un agent chélateur.
- c) La présence de macromolécules directement marquées dans le sang résulte d'un bruit de fond radioactif élevé et limite la sensibilité et la spécificité de la détection. Pour réduire le bruit de fond, notre stratégie se base sur le concept de pré-ciblage et l'incorporation d'une étape de nettoyage entre le ciblage et la détection.

PET Imaging of Apoptosis with ^{64}Cu -Labelled Streptavidin following Pre-targeting of Phosphatidylserine with Biotinylated Annexin-V

Nicole Cauchon¹, Réjean Langlois¹, Jacques A. Rousseau¹, Guillaume Tessier¹,
Jules Cadorette¹, Roger Lecomte¹, Darel J. Hunting¹,
Roberto A. Pavan², Stefan K. Zeisler², Johan E. van Lier¹

¹Department of Nuclear Medicine and Radiobiology, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada

²Applied Technology Group, TRIUMF, Vancouver, BC, Canada

For correspondence contact: Johan E. van Lier, PhD, Université de Sherbrooke, Faculty of Medicine and Health Sciences, Department of Nuclear Medicine and Radiobiology, 3001 12th Avenue North, Sherbrooke, Quebec, Canada J1H 5N4
e-mail: johan.e.vanlier@usherbrooke.ca
Tel.: +1-819-564-5409, Fax: 1-819-564-5442

Running title: Apoptosis imaging with pretargeted ^{64}Cu

Abstract. In vivo detection of apoptosis is a diagnostic tool with potential clinical applications in cardiology and oncology. Radiolabeled annexin-V (anxV) is an ideal probe for in vivo apoptosis detection due to its strong affinity for phosphatidylserine (PS), the molecular flag on the surface of apoptotic cells. Most clinical studies to visualize apoptosis have used ^{99m}Tc -anxV, however its poor distribution profile often compromises image quality. Here, tumor apoptosis after therapy is visualized by positron emission tomography (PET) using ^{64}Cu -labeled streptavidin (SAv), following pre-targeting of apoptotic cells with biotinylated anxV. **Methods:** Apoptosis was induced in tumor-bearing mice by photodynamic therapy (PDT) using phthalocyanine dyes as photosensitizers, and red light. After PDT, mice were injected i.v. with biotinylated anxV, followed 2 h later by an avidin-chase, and after another 2 h with ^{64}Cu -DOTA-biotin-SAv. PET images were subsequently recorded up to 13 h after PDT. **Results:** PET images delineate apoptosis in treated tumors as early as 30 min after ^{64}Cu -DOTA-biotin-SAv administration with tumor-to-background ratios reaching a maximum at 3 h post-injection, i.e. 7 h post-PDT. Omitting the administration of biotinylated anxV or the avidin-chase failed to provide a clear PET image, confirming that all three steps are essential for adequate visualization of apoptosis. Furthermore, differences in action mechanisms between photosensitizers that target tumor cells directly or via initial vascular stasis were clearly recognized by differences in tracer uptake patterns detecting early or delayed apoptosis. **Conclusion:** This study demonstrates the efficacy of a three-step ^{64}Cu -pretargeting procedure for PET imaging of apoptosis. Our data also confirm the usefulness of small animal PET to evaluate cancer treatment protocols.

Introduction

The ability to visualize and quantify apoptosis [1] has many critical clinical applications in the early detection of organ transplant rejection, the assessment of myocardial damage, as well as the management of cancer therapy and a range of degenerative diseases [2, 3]. Apoptosis is initiated by externalization of phosphatidylserine (PS), which persists until the final degradation of the cell. Annexin-V (anxV), a human protein (35.8 kD), binds specifically with nanomolar affinity ($K_d = 7$ nM) to membrane-bound, externalized PS. Radiolabeled anxV has been studied extensively for the detection of apoptosis both in animals and humans; most clinical experience has been gained with a ^{99m}Tc -labeled anxV complex modified with a hydrazine-nicotinamide ligand (^{99m}Tc -Hinyc-anxV) [4]. Various attempts to improve the pharmacokinetics of ^{99m}Tc -labeled anxV have been put forth, including the use of different linkers (e.g. imino-mercaptobutyl, BATP) or genetically modified anxV [2-11]. Longer lived ^{111}In -DTPA-PEG-anxV tracers for SPECT [12] and short lived ^{18}F -radiolabeled anxV for PET imaging have also been studied in animal models [13]. To date, ^{99m}Tc -Hinyc-anxV is believed to be the most promising tracer for apoptosis imaging and its commercial availability has allowed this radiopharmaceutical to enter phase II/III trials in patients. It is however generally considered that routine clinical application will require a tracer with an improved biodistribution profile resulting in better image contrast [2, 3].

An indirect procedure to transport a radiotracer to target tissues with improved selectivity capitalizes on the extremely high affinity ($K_d = \text{fM}$) of avidin and streptavidin (SAv) for biotin [14, 15]. The procedure involves pretargeting macromolecular probes with a biotin- or SAv-modified vector followed by administration of the radiotracer as a

SAv or biotin complex. This approach has been used successfully in flow cytometry for adherent cells [16] and histochemistry [17, 18] to detect apoptosis and also for tumor imaging and radioimmunotherapy [19-22]. Target-to-radioactivity background ratios can be further improved by injecting a molecular-chase prior to administration of the radiotracer to remove residual vector from the bloodstream [23].

Here we apply this three-step protocol to imaging apoptosis induced by photodynamic therapy (PDT) in an experimental animal tumor model [24]. This model is well established and uses a photosensitizer and visible light to generate reactive oxygen species (ROS) in situ, particularly cytotoxic singlet oxygen, resulting in apoptosis and tumor regression [25, 26]. The availability of photosensitizers with different tissue and cellular distribution patterns allows for modulation of the tumor apoptotic or necrotic response. In the present study we selected two adjacently substituted disulfonated phthalocyanines (AlPcS₂ and ZnPcS₂) as photosensitizers. ZnPcS₂ has been shown to act directly on the tumor cells causing rapid and extensive damage within the illuminated area. Its effect on the vasculature is mild and limited to an increase in blood vessel permeability [27]. In contrast, AlPcS₂-PDT induces both a direct cellular effect and a significant reduction of blood flow [28].

In this study apoptotic cells are first pretargeted with commercially available biotinylated anxV. This is followed by an avidin-chase to eliminate free biotinylated products. Subsequent administration of ⁶⁴Cu-labeled SAv then allows apoptotic tissues to be imaged by positron emission tomography (PET). In parallel to the animal PET studies, apoptosis was confirmed by conventional in vitro and in vivo staining procedures as well as ex vivo radioactivity counting of selected tissue samples.

Materials and methods

All solutions were prepared with ultra pure water ($>18.0 \text{ M}\Omega\text{-cm}$ resistivity). Unless otherwise stated, all chemicals were purchased from Sigma-Aldrich Canada Ltd (Oakville, ON, Canada), except for avidin, biotinylated anxV and SAV (Invitrogen Canada Inc., Burlington, ON, Canada). ^{64}Cu yields, prepared on site at the Sherbrooke Molecular Imaging Centre, were measured with a CRC-35R dose calibrator (Capintec, Ramsey, NJ). Radioactive tissue samples were counted in a Wallac model 1282 universal γ -counter. Balb/c mice were obtained from Charles River Breeding Laboratories (Montreal, QC, Canada). Protein concentrations were measured by the Bio-Rad DC Protein Assay (Bio-Rad, Hercules, CA). To validate the labeling efficiency of SAV, SDS-PAGE was performed on a Mini protean 3 and POWER PAC 1000 (Bio-Rad, Hercules, CA). Electrophoresis was performed by one dimensional 10% SDS-PAGE according to the method of Laemmli [29]. Laemmli sample buffer (4 μL) was added to each sample (20 μL) and the mixtures were heated at 95°C for 5 min. After chilling the samples were loaded on the gel and electrophoresis was performed under constant voltage (200 V) and stopped when the migration line reached 2/3 of gel length in order to retain the low molecular weight protein. Precision Protein Standard (#161-0318, Bio-Rad, Hercules, CA) was used as reference material. After electrophoresis, gels were stained by Coomassie blue and the radioactivity was detected on an Instant Imager (Packard, A2024 Imager, Downers Grove, IL).

Photosensitizers, i.e. the adjacently disulfonated Zn(II) and Al(III) phthalocyanines (ZnPcS_2 and AlPcS_2), were prepared as previously described [30]. The dyes ($\sim 10 \text{ mg}$) were dissolved in 1% PBS (3 mL), sonicated for a few minutes and filtered over a $0.22 \mu\text{m}$ filter (Millipore) under sterile condition. The final concentration of the dyes was ad-

justed with 1% PBS to 100 μM after determining the concentration by UV-vis spectroscopy of a 50-fold diluted sample in methanol ($\epsilon=250,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ at $\lambda_{\text{max}}=680 \text{ nm}$).

Preparation of ^{64}Cu -DOTA-biotin-SAv (Fig. 1)

The radio-copper ion is readily incorporated into biomolecules modified with DOTA (1,4,7,10-tetraazacyclododecane- N,N',N'',N''' -tetraacetic acid) as a chelator [31]. Labeling of SAv with ^{64}Cu involves coupling DOTA to biotin, followed by chelating with ^{64}Cu and loading of the ^{64}Cu -DOTA-biotin complex onto an excess of SAv to yield a stable ^{64}Cu -DOTA-biotin-SAv conjugate. Based on the theoretical binding affinity of SAv for biotin (i.e. 14 U/mg SAv, where 1 U binds 1 μg of biotin), 2 mg of SAv requires 28 μg (114.6 nmoles) of biotin for saturation. Therefore, to assure that sufficient biotin binding sites remained available, SAv was loaded with seven-fold less biotin-DOTA than required for complete saturation. The presence of at least three free biotin-binding sites on the partly substituted SAv tetramer ensures that sufficient binding sites remain available to bind biotinylated anxV under physiological conditions. The latter was confirmed in vitro and ex vivo, using a commercially available fluorescent SAv derivative as reference [32].

Copper-64 ($t_{1/2}=12.7 \text{ h}$) was prepared on a TR-19 cyclotron (Advanced Cyclotron Systems, Richmond, BC, Canada) by the reaction $^{64}\text{Ni}(p,n)^{64}\text{Cu}$ using an enriched ^{64}Ni target electroplated on a solid rhodium disc (22 mm diameter, 1 mm thickness) [33]. ^{64}Ni was purchased from Isoflex (San Francisco, CA). $^{64}\text{CuCl}_2$ was recovered from the target material following the procedure of McCarthy et al. [34] and converted to ^{64}Cu -acetate by dissolving the $^{64}\text{CuCl}_2$ in 1 mL ammonium acetate (0.1 M; pH 5.5), followed by evaporation to dryness.

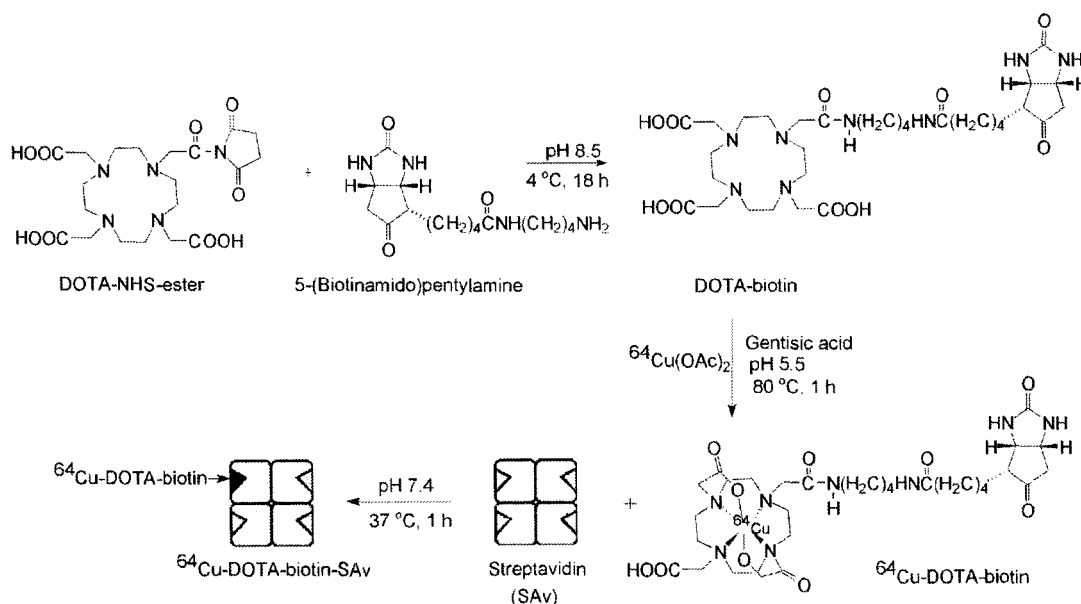


Figure IV.1 Three-step synthesis of ^{64}Cu -DOTA-biotin-SAv.

Biotinamidopentylamine-DOTA (DOTA-biotin) was prepared by reacting 5-(biotinamido)pentylamine (15.8 mg, 48.1 μmole) (Pierce, Rockford, IL) in 50 μL of sodium bicarbonate (0.2 M; pH 8.5) with DOTA-NHS-ester (48 mg, 95.3 μmole) (Macrocyclics, Dallas, TX) [35]. A MALDI-MS (TOF Spec 2E, Micromass, Waters) of the complex gave the expected $[\text{M}+\text{H}]$ ion at m/z 715.3812.

DOTA-biotin was labeled with ^{64}Cu using a modified published procedure [36]. Briefly, ^{64}Cu -acetate (925 MBq) in 383 μL of ammonium acetate buffer (AAc; 0.1 M; pH 5.5) was added to 100 μL of AAc containing 2,5-dihydroxybenzoic acid (10 mg/mL) and 27 μL of AAc containing DOTA-biotin (40 μg , 0.05 μmole). After 1 h incubation at 80°C, 20 μL of a 0.5 M solution of EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) was added, the mixture was incubated 5 min at room temperature and then purified over a C-18 Sep-Pak cartridge (Waters). Free ^{64}Cu -acetate was eluted from the cartridge with 6 mL of

AAC, where after the ^{64}Cu -DOTA-biotin complex (14.8 GBq/ μmole) was eluted with 1 mL of ethanol and evaporated to dryness.

For the conjugation of ^{64}Cu -DOTA-biotin with SAV we used a modified procedure based on that published by Molecular Probe (V-23200). Briefly, SAV (2 mg, 28 U) in 500 μL PBS (fortified with 2.7 mM KCL and 0.138 M NaCl) was added to 740 MBq of ^{64}Cu -DOTA-biotin (corresponding to ~ 17 nmoles of biotin). The mixture was incubated for 1 h at 37 °C, concentrated to 100 μL on a 10K Nanosep® Centrifugal Device (VWR International), diluted with 200 μL of PBS and again concentrated to 100 μL . This procedure was repeated three times to remove unbound ^{64}Cu -DOTA-biotin. The ^{64}Cu -DOTA-biotin-SAV conjugate was diluted in physiological saline and filtered over a 0.22 μm filter (Millipore) prior to administration to mice.

Efficacy of ^{64}Cu -DOTA-biotin-SAV to detect PSer-bound biotinylated anxV

In vitro detection of apoptosis after PDT

The efficacy of ^{64}Cu -DOTA-biotin-SAV to bind to biotinylated anxV retained by PS on the external membrane of apoptotic cells was compared to that of a commercially available SAV-fluorescent probe. Apoptosis was induced by PDT in EMT-6 cells such as to induce about 50% cell death. EMT-6 murine mammary tumor cells were maintained in T75 flasks in a Waymouth medium culture (Gibco, Burlington, ON, Canada) supplemented with 15% fetal bovine serum (FBS), 1% glutamine and 1% pen-strep (Gibco) and kept at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO_2 . Cells (1×10^5 cells/mL) were plated on glass cover slips and incubated for 18-24 h at 37°C, 5% CO_2 to allow for cell adhesion and growth. The medium was then removed; the cells were rinsed twice with PBS and overlaid with 1 mL of photosensitizer (10 μM) in culture medium supple-

mented with 1% FBS. After 3 h at 37°C, the dye solution was removed and the cells were washed twice with PBS, refed with 1 mL of Waymouth 15% FBS and exposed for varying time intervals to red light (10 mW cm⁻² at $\lambda = 660\text{-}700$ nm). Plates were incubated 4 h at 37°C under 5% CO₂ to allow for expression of apoptosis where after the medium was removed. Cells were then washed twice with PBS, twice with low phosphate buffer (HBSS/HEPES) and incubated 1 h with biotinylated anxV (150 ng). Cells were again washed twice with HBSS/HEPES to remove free biotinylated anxV and incubated 1 h with Alexa fluor 350 SA_v (300 ng) or ⁶⁴Cu-DOTA-biotin-SA_v (3.7 MBq). Finally the dye or radioactive solution was removed, the cells were washed twice with PBS and fluorescence was observed without counter stain with a fluorescent microscope (Axioscop 2, Zeiss) equipped with band pass filters ($\lambda_{\text{ex}} = 480/30$ nm; $\lambda_{\text{em}} = 535/40$ nm or $\lambda_{\text{ex}} = 560/40$ nm; $\lambda_{\text{em}} = 630/60$ nm; Chroma Technology Corp.). Photomicrographs were obtained using a digital camera and enhanced with SPOT software. Radioactivity was visualized with an Instant Imager (Packard). Apoptosis after PDT of the EMT-6 cells was confirmed by the detection of DNA fragmentation accordingly to the procedure described by Bissonnette et al. [37].

Ex vivo detection of apoptosis after in vivo PDT

The animal experiments were conducted in female BALB/c mice (17-20 g, Charles River Breeding Laboratories, Montreal, QC, Canada), in accordance with the recommendations of the Canadian Council on Animal Care and the in-house ethics committee for Animal Experiments. Before tumor implantation, hair on the hind legs and the backs was removed by shaving and epilating. The two tumors were implanted on the back of the animals by i.d. injection of $2\text{-}3 \times 10^5$ EMT-6 cells suspended in 0.05 mL Waymouth's growth medium. One week after tumor inoculation, when tumor diameters reach 5-8 mm (2-3 mm thick),

animals received photosensitizer (1 $\mu\text{mol/kg}$, i.v.) followed 24 h later by diode laser-light treatment (D&W TEK, Newark, DE, USA) of one tumor (8-mm beam; $\lambda=680$ nm, 200 mW/cm^2 for a total fluence of 400 J/cm^2). The other tumor was shielded from light exposure and served as a control. Two animals from each group (ZnPcS₂- and AlPcS₂-PDT) were injected with biotinylated an_xV (10 $\mu\text{g/kg}$) at different time intervals post-PDT and sacrificed 1 h later by cervical dislocation. Tumors were then excised, fixed in 10% buffered formalin, embedded in paraffin and cut in 4 μm section with a microtome. The histological slides were processed in toluene and methanol to remove paraffin and stained with the Alexa Fluor 350 SAv (0.4 μg) or ⁶⁴Cu-DOTA-biotin-SAv (9.25 MBq). Apoptosis was confirmed by the detection of DNA fragmentation in the homogenate of the frozen, excised tumors [37].

Timing of the pretargeting and imaging steps***Effect of delay time between PDT and administration of biotinylated anxV***

Cellular expression of PS evolves as a function of time after PDT. Consequently optimal detection of apoptosis requires appropriate timing of the pretargeting step. The effect of the delay between PDT and the administration of biotinylated anxV was investigated by injecting biotinylated anxV (10 µg/kg, i.v.) before PDT, immediately after PDT, and 1 and 3 hours post-PDT. After administration of biotinylated anxV, the avidin chase (0.5 mg/kg, i.p.) was performed 2 h later, followed after another 2 h by the ^{64}Cu -tracer (7.4 MBq, via the lateral tail vein). The animals were euthanized 3 h later. Tumors were excised, washed with physiological saline, blotted dry and put in pre-weighted tubes for radioactivity counting. Tissue ^{64}Cu -uptake was expressed as the percent of the injected dose per gram of tissue (%ID/g).

Blood Clearance of ^{64}Cu -DOTA-biotin-SAv

In addition to target uptake, the optimal time for image contrast after ^{64}Cu -DOTA-biotin-SAv administration depends on the background (i.e. blood) radioactivity level. Preferably, blood clearance should be at least >90%. From the above biotinylated anxV timing study the following protocol was selected. Immediately after PDT animals were injected (i.v.) with biotinylated anxV, followed 2 h later with the avidin-chase and after another 2 h with the ^{64}Cu -tracer (3.7 MBq, or 0.185 MBq/g mouse). Three groups of four animals were used. The first group received no treatment (reference), the other two groups were treated either by ZnPcS_2 - or AlPcS_2 -PDT. Blood samples (100 µL) were collected by ophthalmic bleeding at different time periods post-injection of the ^{64}Cu -tracer using heparinized Micro-Hematocrit Capillary tubes (Fisher Scientific). The samples were cen-

trifuged for 3 min at 13,700 g, the length of the plasma and blood cellular fraction was measured and the plasma and cellular fractions were counted separately after cutting the capillary at the junction between the two fractions. These values were subsequently used to calculate the ^{64}Cu -concentration as %ID/g.

Biodistribution of ^{64}Cu -DOTA-biotin-SAv

Based on the above studies, we selected an imaging protocol whereby the pretargeting step follows immediately after PDT. This is followed 2 h later by the avidin-chase and after another 2 h by administration of the ^{64}Cu -DOTA-biotin-SAv complex (7.4 MBq). Animals were euthanized 3 h after injection of the ^{64}Cu -tracer, i.e. when blood radioactivity concentration had dropped <90%. Blood samples and various organs were collected as described above and counted for ^{64}Cu to calculate the %ID/g.

PET imaging of apoptosis

For PET imaging of apoptosis the same pretargeting protocol was used as described for the biodistribution study with the exception that a 10-fold higher dose of ^{64}Cu -DOTA-biotin-SAv (37 MBq) was used. Whole body images of mice were acquired using a dedicated small animal PET scanner [38, 39], starting immediately and up to 9 h after injection of the ^{64}Cu -tracer (i.e. up to 13 h post-PDT).

Statistical Analysis

Statistical computations were performed using GraphPad Prism, version 4.0 (GraphPad Software Inc. San Diego, CA). The standard deviation of the mean (SD) was used to estimate the spread of data around the mean. The mean %ID/g value for the dif-

ferent organs was compared using one way analysis of variance (ANOVA) and a Tukey contrast test. A probability value of $p = 0.05$ or less was considered statistically significant.

Results

Preparation of ^{64}Cu -DOTA-biotin-SAv

^{64}Cu -DOTA-biotin (spec. act. $\sim 15 \text{ GBq}/\mu\text{mol}$) was prepared in $>95\%$ yield while conjugation with SAv to yield the ^{64}Cu -DOTA-biotin-SAv conjugate (spec. act. $\sim 11 \text{ GBq}/\mu\text{mol}$) proceeded in $>70\%$ yield based on ^{64}Cu content (Figure IV.1). The ^{64}Cu -DOTA-biotin complex was analyzed by normal phase HPLC confirming the absence of 5-(biotinamido)-pentylamine ($t_R = 17.2 \text{ min}$) while only a single peak of the ^{64}Cu -DOTA-biotin complex was detected at 18.6 min. Both the ^{64}Cu -DOTA-biotin and ^{64}Cu -DOTA-biotin-SAv complexes were analyzed by electrophoreses confirming the homogeneity of the samples (Fig. IV.2). Typically the overall radiolabeling process can be completed within 2 h.

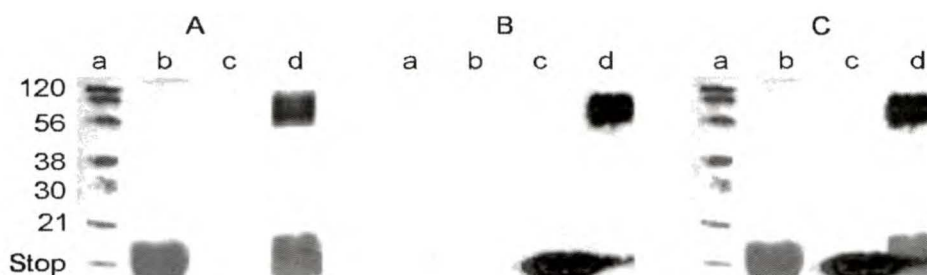
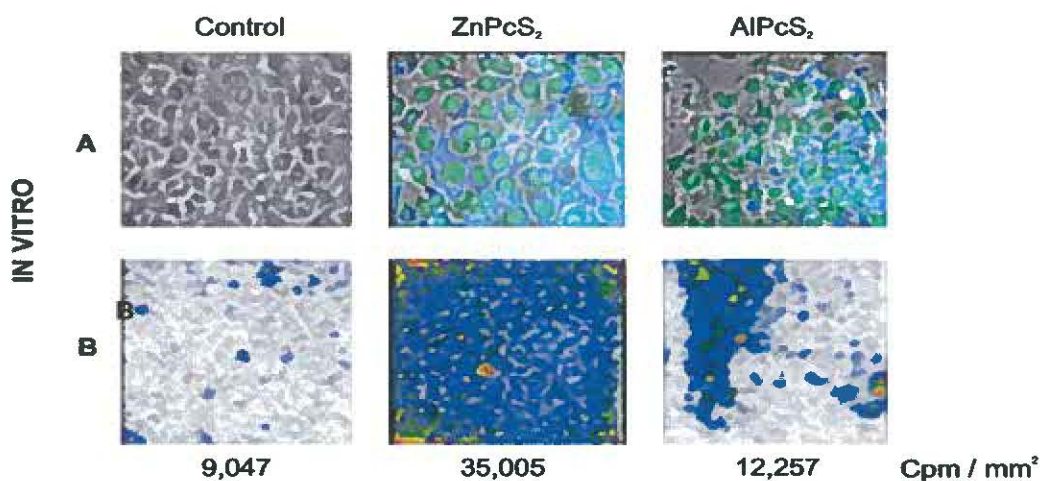


Figure IV.2 SDS-PAGE analysis of ^{64}Cu -DOTA-biotin and ^{64}Cu -DOTA-biotin-SAv. Following electrophoresis, proteins were visualized by Coomassie staining (A, left) and radioactivity was detected in an Instant Imager (B, center). The superimposed protein and radioactivity images are presented on the right (C). Lane a, molecular weight standards; lane b, SAv; lane c, ^{64}Cu -DOTA-biotin; lane d, ^{64}Cu -DOTA-biotin-SAv.

Efficacy of ^{64}Cu -DOTA-biotin-SAv to detect PSer-bound biotinylated anxV

In vitro detection of apoptosis after PDT

Comparison of ^{64}Cu -DOTA-biotin-SAv uptake by apoptotic cells to that of a commercially available SAv-fluorescent probe showed that the radioactive tracer mimicked the localization pattern of the fluorescent probe (Fig. IV.3, top image). Differences in the number of apoptotic cells after ZnPcS_2 - and AlPcS_2 -PDT are evident from the labeling intensities observed with either probe. Both probes show higher uptake after ZnPcS_2 -PDT as compared to AlPcS_2 -PDT, which is conform to the known higher photosensitizing efficacy of the former. Although the resolution with the Instant Imager (~ 1 mm) is low as compared to fluorescence microscopy, a good correlation between the fluorescence and radioactivity distribution is observed. The induction of apoptosis after PDT was confirmed by the characteristic DNA fragmentation in the extract of the treated cells (Fig. IV.4).



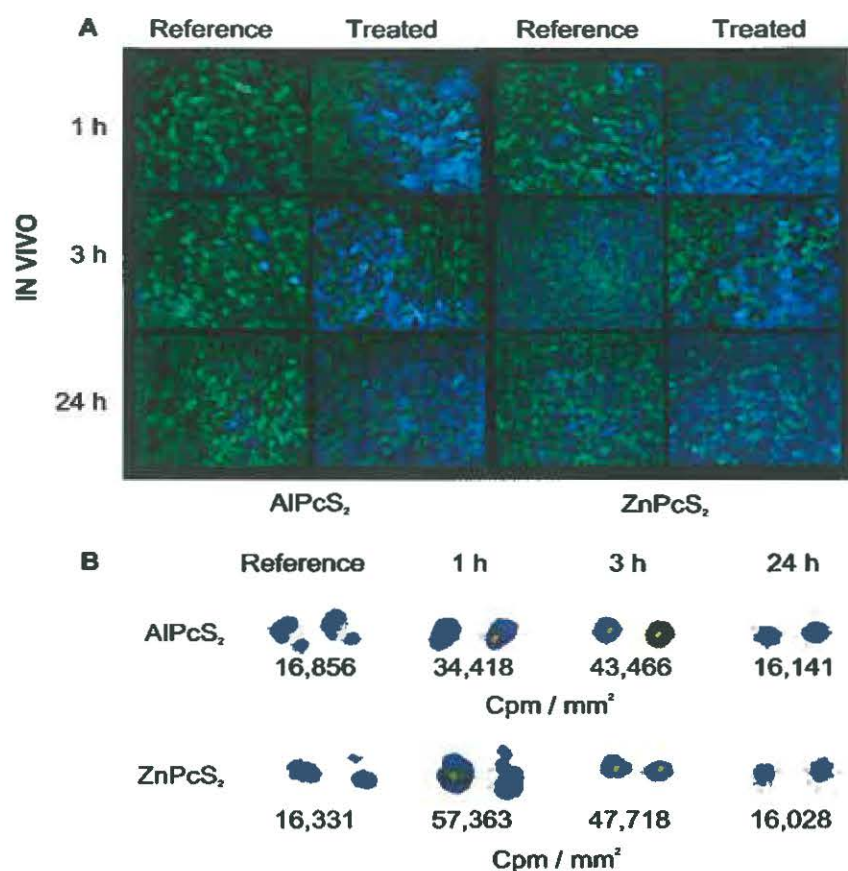


Figure IV.3 Detection of apoptosis with fluorescent-SAv and ⁶⁴Cu-DOTA-biotin-SAv. For in vitro detection, cells were grown on glass cover slips and treated by either AlPcS₂- or ZnPcS₂-PDT using LD₅₀ conditions. Control cells did not receive PS or light. Four hours after PDT, the cells were incubated with biotinylated anxV for 1 h and then for another hour with Alexa Fluor 350 SAv or ⁶⁴Cu-DOTA-biotin-SAv. Indirect fluorescence was examined by fluorescence microscopy (a) and the radioactivity was scanned by an Instant Imager (b). The average number of counts per mm² (n = 4) is listed on each scan. For the ex vivo detection of apoptosis after in vivo PDT, EMT-6 tumor-bearing animals were injected i.v. with biotinylated anxV at 1, 3 and 24 h post-PDT and euthanized 1 h later. Tumors were excised, sliced and stained for 1 h (a) with Alexa Fluor 350 SAv and examined by fluorescence microscopy and (b) with ⁶⁴Cu-DOTA-biotin-SAv and scanned by an Instant Imager.

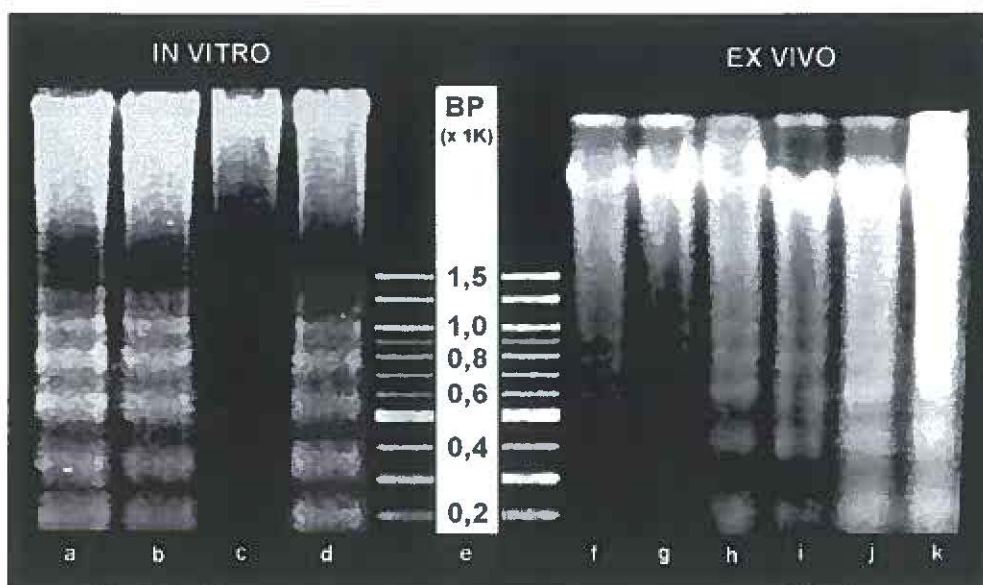


Figure IV.4 Fragmentation of DNA following PDT. Twenty-four (24) h after in vitro PDT (left image), DNA was extracted from the EMT-6 cells, submitted to electrophoresis on a 2.0% agarose gel to separate characteristic fragments, treated with propidium iodide and examined under UV light. Lane a, cells treated by AlPcS₂-PDT; Lane b, cells treated by ZnPcS₂-PDT; Lane c, control cells; Lane d, UVC-treated cells as positive control. For ex vivo detection of apoptosis after in vivo PDT (right image), mice were sacrificed 24 h or 48 h post-PDT, tumors were excised, DNA was isolated and subjected to electrophoresis. Lanes f and g, reference after ZnPcS₂- and AlPcS₂-administration without light treatment; Lanes h and j, 24 h after ZnPcS₂- and AlPcS₂-PDT; Lanes i and k, 48 h after ZnPcS₂- and AlPcS₂-PDT, respectively.

Ex vivo detection of apoptosis after in vivo PDT

The presence biotinylated anxV on apoptotic cells after in vivo PDT was confirmed via an ex vivo procedure using both Alexa-Fluor 350 SAV and ⁶⁴Cu-DOTA-biotin-SAV. Tumor slices were examined for fluorescence by microscopy and scanned for ⁶⁴Cu using an Instant Imager. Both ZnPcS₂- and AlPcS₂-PDT-treated tumors show significant uptake of either SAV probe, with the amount of cellular damage after ZnPcS₂-PDT exceeding that after AlPcS₂-PDT substantially (Fig.IV. 3, ex vivo, a and b). Control tumors show little evidence of apoptosis. Qualitative analysis of the ⁶⁴Cu-uptake pattern confirms the pres-

ence of biotinylated anxV in the treated tumor slices (Fig. IV.3, ex vivo, b). Comparison of the radioactivity counts suggests that the highest ^{64}Cu -uptake is reached early after PDT (~ 3 h after AlPcS₂-PDT or ~ 1 h after ZnPcS₂-PDT). As done for the above in vitro study, apoptosis was confirmed by the characteristic DNA fragmentation observed in the tumor extracts (Fig. IV.4).

Timing of the pretargeting and imaging steps

Effect of delay time between PDT and administration of biotinylated anxV

In order to estimate the optimal timing of the pretargeting step, biotinylated anxV was administrated before PDT, immediately after PDT and 1-3 h post-PDT. The avidin-chase and ^{64}Cu -DOTA-biotin-SAv injection were kept at 2 h and 4 h post-PDT, respectively. There was only a small difference in ^{64}Cu -DOTA-biotin-SAv uptake between the reference and illuminated tumors when the pretargeting step was performed just before the beginning of light treatment (Table IV.1). Administering the biotinylated anxV immediately after PDT resulted in a significant increase in the ^{64}Cu -tumor uptake, characterized by a high treated over non-treated ratio (>8 after ZnPcS₂-PDT and >3 after AlPcS₂-PDT). Increasing the interval between PDT and the pretargeting step resulted in a decrease in ^{64}Cu -uptake by the treated tumor; the effect remained more pronounced after ZnPcS₂-PDT (Table IV.1).

Table IV.1 Effect of the delay time between PDT and the administration of biotinylated anxV on the ^{64}Cu -tumor uptake ratio.

Timing of pretargeting step	^{64}Cu -tumor uptake ratio*	
	ZnPcS ₂ -PDT	AlPcS ₂ -PDT
Just before PDT	2.27 ± 0.57	1.63 ± 0.00
Just after PDT	8.67 ± 0.57	3.09 ± 0.15
1 h post-PDT	5.17 ± 1.46	2.34 ± 0.25
3 h post-PDT	2.22 ± 0.37	1.44 ± 0.25

Balb/c mice (n=5) bearing two EMT-6 tumors received i.v. either AlPcS₂ or ZnPcS₂ as a PS; 24-h later one of the tumors was treated with red light. Apoptotic sites were pretargeted with biotinylated anxV at the indicated time, followed after 2 h by the avidin-chase and after another 2 h by i.v. injection of ^{64}Cu -DOTA-biotin-SAv (7.4 MBq). Animals were euthanized 3 h later (i.e. 7 h post-PDT), tumors were excised and counted to give the activity as %ID/g. Tumor uptake ratios and standard deviation (SD) were calculated from the ^{64}Cu activities in the treated-over-reference tumors.

Blood clearance of ^{64}Cu -DOTA-biotin-SAv

The blood clearance of ^{64}Cu -DOTA-biotin-SAv following the three-step imaging procedure was measured in tumor bearing mice treated by PDT and in a reference group that did receive photosensitizer without light treatment. The activity in the plasma (Fig. IV.5, top) and blood cell fraction (Fig. IV.5, bottom) are presented as a function of time after injection of the ^{64}Cu -tracer. Most of the ^{64}Cu -DOTA-biotin-SAv complex was associated with the plasma fraction (>95%), confirming good bio-availability of the tracer. Using a single compartment model the plasma half-life was of the order of 60 min for both the treated and control group. Using a two-compartment model gave estimated α - and β -half lives at 49 min and 8 h. The injected tracer dose was 0.185 MBq/g mouse, which translates to an initial blood concentration of 2.46 MBq/g (assuming a total blood volume of 1.5 mL/20 g mouse). Three hours after the administration of ^{64}Cu -DOTA-biotin-SAv (i.e. 7 h post-PDT) the plasma concentration of the tracer decreased to 0.07

MBq/g, i.e. 2.8 % of the initial blood concentration, which is sufficiently low to assure adequate image contrast.

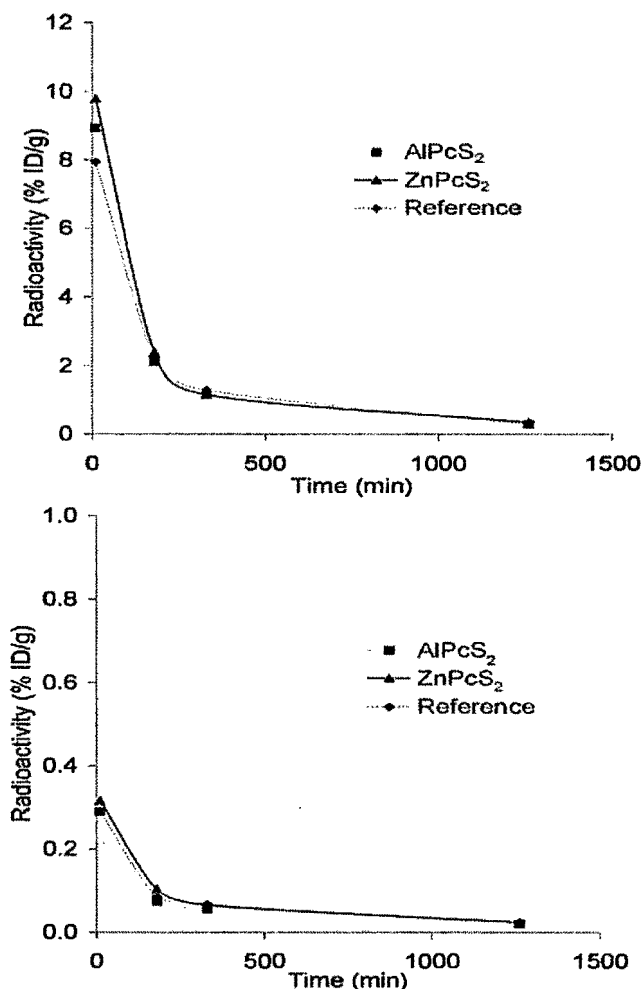


Figure IV.5 Plasma clearance of ^{64}Cu -DOTA-biotin-SAv. Tumor bearing mice were treated by AlPcS₂- or ZnPcS₂-PDT and immediately after illumination injected i.v. with biotinylated anxV, 2-h later with an avidin-chase and after another 2-h with ^{64}Cu -DOTA-biotin-SAv. Blood was collected (100 μL) by orbital sinus bleeding at different time intervals. Plasma and blood cells were separated by centrifugations and counted separately to give ^{64}Cu -clearance curves for both the plasma (top) and blood cell compartments (bottom).

Biodistribution of ^{64}Cu -DOTA-biotin-SAv

The tissue distribution of ^{64}Cu after PDT in tumor bearing mice was established using the three-step imaging procedure with optimal timing parameters derived from the

above studies. This protocol consists of administrating the pretargeting step immediately after PDT, followed 2 h later by the avidin-chase and after another 2 h by ^{64}Cu -tracer injection. Tracer concentration (%ID/g) in the various tissues is presented together with tissue-to-blood ratios (Table IV.2). The overall tissue distribution pattern of the control and PDT-treated groups is similar, with most of the radioactivity being found in the kidneys. There is however a striking increase in ^{64}Cu -uptake by the illuminated tumor and the surrounding muscle as compared to the control group, most noticeable after treatment with the more potent ZnPcS_2 photosensitizer.

Table IV.2 Biodistribution of ^{64}Cu -DOTA-biotin-SAv in tumor bearing mice.

Tissue	Control mice	Treated mice*	
		AlPcS ₂ -PDT	ZnPcS ₂ -PDT
		%ID/g \pm SD	
Blood	0.98 \pm 0.39	0.68 \pm 0.18	0.40 \pm 0.05
Heart	0.38 \pm 0.14	0.27 \pm 0.07	0.21 \pm 0.02
Liver	0.69 \pm 0.20	0.60 \pm 0.12	0.65 \pm 0.11
Lungs	0.49 \pm 0.16	0.37 \pm 0.13	0.31 \pm 0.04
Kidneys	3.13 \pm 0.66	2.18 \pm 0.25	2.59 \pm 1.38
Spleen	0.29 \pm 0.12	0.26 \pm 0.05	0.23 \pm 0.03
Brain	0.03 \pm 0.02	0.02 \pm 0.00	0.02 \pm 0.00
tr-Muscle	--	0.25 \pm 0.13	0.57 \pm 0.24
tr-Tumor	--	0.79 \pm 0.17	0.92 \pm 0.05
ref-Muscle	0.11 \pm 0.05	0.10 \pm 0.04	0.17 \pm 0.02
ref-Tumor	0.45 \pm 0.08	0.26 \pm 0.06	0.11 \pm 0.01
Fat	0.27 \pm 0.30	0.13 \pm 0.06	0.10 \pm 0.02
		Tissue-to-blood ratio \pm SD	
Blood	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00
Heart	0.40 \pm 0.04	0.41 \pm 0.08	0.49 \pm 0.08
Liver	0.70 \pm 0.16	0.91 \pm 0.14	1.47 \pm 0.34
Lungs	0.52 \pm 0.14	0.55 \pm 0.07	0.76 \pm 0.05
Kidneys	3.19 \pm 0.40	3.40 \pm 0.98	3.22 \pm 1.44
Spleen	0.29 \pm 0.06	0.38 \pm 0.06	0.56 \pm 0.06
Brain	0.04 \pm 0.03	0.03 \pm 0.00	0.04 \pm 0.01
tr-Muscle	--	0.36 \pm 0.13	1.27 \pm 0.72
tr-Tumor	--	1.19 \pm 0.15	2.19 \pm 0.31
ref-Muscle	0.15 \pm 0.07	0.15 \pm 0.08	0.42 \pm 0.39
ref-Tumor	0.58 \pm 0.11	0.35 \pm 0.05	0.25 \pm 0.04
Fat	0.25 \pm 0.21	0.19 \pm 0.06	0.22 \pm 0.10

* Balb/c mice (n = 3-8) bearing two EMT-6 tumors received i.v. either AlPcS₂ or ZnPcS₂ as a PS; 24-h later one of the tumors was treated with red light. Apoptotic sites were pretargeted with biotinylated anxV immediately after PDT, 2 h later free biotin was removed by an avidin-chase and after another 2 h animals received i.v. ⁶⁴Cu-DOTA-biotin-SAv (7.4 MBq). Animals were sacrificed 3 h later (i.e. 7 h post-PDT), dissected and samples were counted to calculate activities as %ID/g, tissue-to-blood ratios and the standard deviations (SD). Control mice did not receive dye or light treatment. Muscle samples were taken from the area around the illuminated tumor (tr) or reference tumor (ref) that was shielded from light.

PET imaging of apoptosis

PET scans of AlPcS₂-PDT treated animals subjected to the three-step ⁶⁴Cu pretargeting protocol (see biodistribution studies above) delineate apoptosis in the treated tumor as early as 30 min after tracer injection (4.5 h post-PDT), reaching a clear contrast between the treated tumor and the surrounding tissue at ~7 h post-PDT (Fig. IV.6A). No radioactivity uptake is detected in the reference tumor (no light). Omission of the biotinylated anxV pretargeting-step fails to reveal ⁶⁴Cu accumulation in the treated tumor, while omission of the avidin-chase results in poor contrast, as demonstrated in the images taken at 5 h post-PDT (Fig. IV.6B-a,b). Optimal delineation of tumor apoptosis is only achieved when all three steps of the pretargeting protocol are applied (Figs. 6B-c). High uptake of the ⁶⁴Cu-DOTA-biotin-SAv conjugate by the bladder and kidneys contrasts with the low radioactivity levels retained by the liver, heart and lungs and is indicative of a renal excretion pathway (Fig. IV.6C).

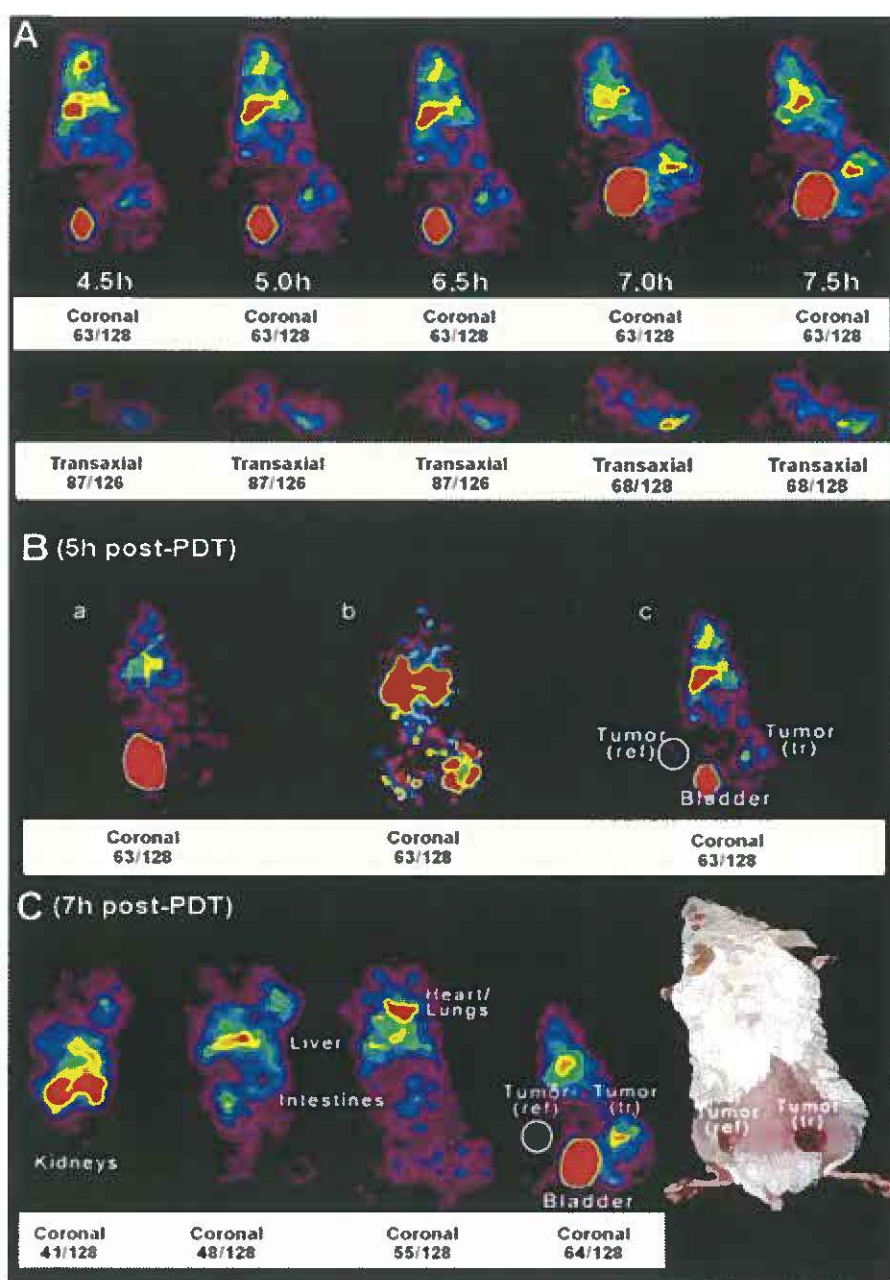


Figure IV.6 The biodistribution of ^{64}Cu -DOTA-biotin-SAv in BALB/c mice bearing two EMT-6 tumors was followed by sequential high resolution PET (see panel B, case c for position of the tumors). Animals were injected with biotinylated anxV immediately after AlPcS₂-PDT, followed by an avidin-chase and ^{64}Cu -DOTA-biotin-SAv, respectively at 2 h and 4 h post-PDT. (A) Scans taken from 4.5-7.5 h after PDT showing both coronal and transaxial slices. (B) Representative coronal slices of ^{64}Cu -scans taken at 5 h post-PDT after: (a) omission of the pretargeting step, (b) omission of the avidin-chase, and (c) implementing the complete three-step ^{64}Cu -pretargeting protocol. (C) Representative slices of regions of interest (kidneys, liver, intestines, heart, lungs, reference (ref) and treated (tr) tumors and bladder) selected from a total body PET scan taken 7-h after PDT.

PET scans of tumor bearing mice after identical PDT procedures but using two different photosensitizers, i.e. AlPcS₂ and ZnPcS₂ over a 7-13 h post-PDT interval, reveal characteristic differences in the tracer uptake pattern (Fig. IV.7-top). At 7 h post-PDT both treatment protocols result in important uptake of radioactivity by the light-treated tumor, which persists for up to 13 h. Comparing the treated over non-treated tracer uptake ratios shows that the more aggressive ZnPcS₂ induces maximum tracer uptake within 6 h post-PDT while the slow-acting AlPcS₂ provokes a late apoptotic response with a maximum at 10-11 h post-PDT (Fig. IV.7-bottom).

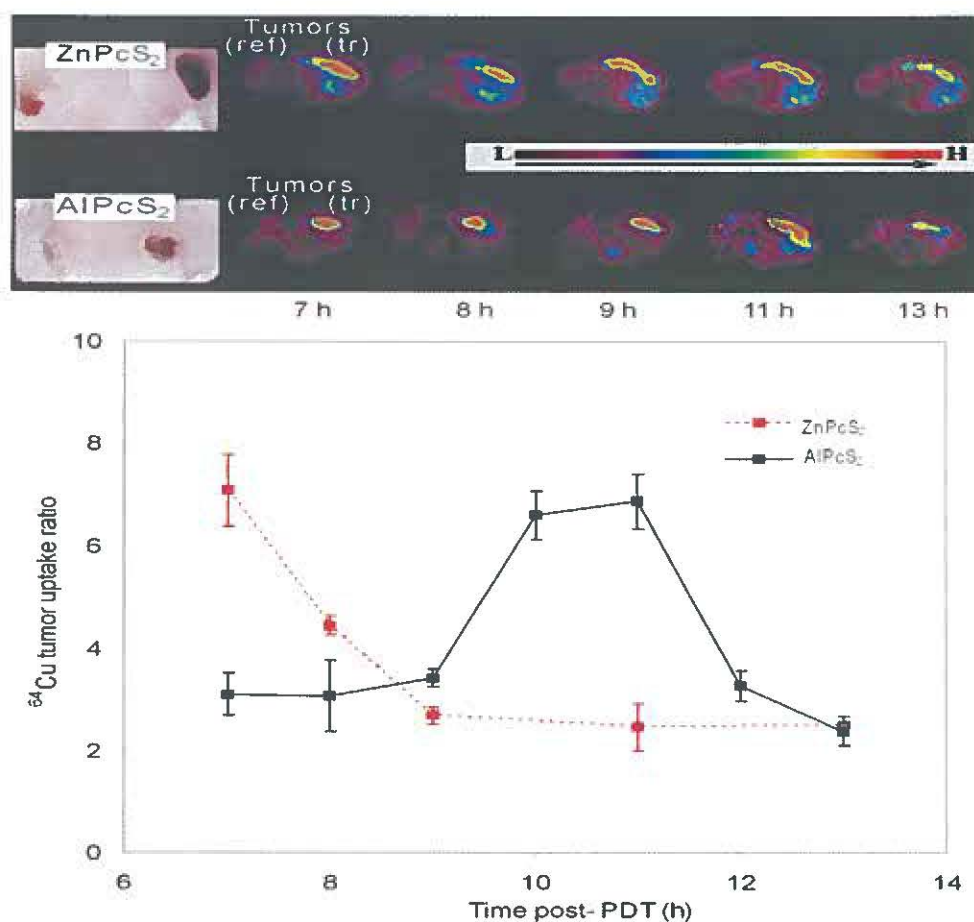


Figure IV.7 (Top) PET image slices through the treated and reference tumors, selected from total body scans taken 7-13 h post-PDT, after ZnPcS₂- or AlPcS₂-PDT. The lower plot shows ⁶⁴Cu tumor uptake-ratios (treated-over-reference tumor) vs. time post-PDT, calculated from the average of three images, including the top image.

Discussion

The preparation of ^{64}Cu -DOTA-biotin-SAv consists of two reactions and two purification steps that can be completed within two hours with minimal equipment requirements. The purity of the intermediate ^{64}Cu -DOTA-biotin complex was confirmed by reversed phase HPLC analysis while the efficiency of the conjugation with SAv to yield the ^{64}Cu -DOTA-biotin-SAv complex was confirmed by electrophoresis (Fig. IV.2). The ^{64}Cu -DOTA-biotin complex and SAv monomer run at the same speed on the SDS gel in spite of large size differences (778 vs. 14.5 KDa). This can be explained by the fact that ^{64}Cu -DOTA-biotin has only one weak negative charge while the SAv is loaded with multiple negatively charged SDS molecules that apparently compensate for its larger size. The presence of free SAv monomer in the ^{64}Cu -DOTA-biotin-SAv reaction mixture (Fig. IV.2) confirms that the ^{64}Cu -DOTA-biotin-SAv complex contains less than 0.75 units of biotin per SAv molecule [13], leaving sufficient binding sites available for interaction with the biotinylated anxV under in vivo conditions. Compared to the direct radiolabeling of anxV the yield is high (>70% based on ^{64}Cu incorporation) and the specific activity ($\sim 11 \text{ GBq}/\mu\text{mol}$) adequate for PET imaging.

Detection of apoptosis by ^{64}Cu -DOTA-biotin-SAv

Binding of ^{64}Cu -DOTA-biotin-SAv to biotinylated anxV attached to PS on apoptotic cell membranes was confirmed by comparing cell and tissue uptake with that of a commercially available fluorescent SAv derivative. After induction of apoptosis by PDT in EMT-6 cells in vitro and pretargeting with biotinylated anxV, both SAv probes revealed similar cellular distribution pattern (Fig. IV.3). Likewise after in vivo PDT, tumors excision and ex vivo staining, both the fluorescence and radioactive SAv probes exhibited

similar uptake profiles (Fig. IV.3). Apoptosis was confirmed both after in vitro and in vivo PDT by detection of the characteristic DNA fragmentation pattern (Fig. IV.4). Differences in ^{64}Cu -uptake as a function of delay-time between PDT and administration of the biotinylated anxV (Fig. IV.3, ex vivo, b) suggest differences in action mechanisms between the Al- or ZnPcS_2 treatment protocols. Higher uptake of the SAV probes after ZnPcS_2 -PDT is in accordance with the more potent direct cell kill potential of the ZnPcS_2 dye. After a 24-h delay, detection of apoptosis is poor for both photosensitizers, using either the fluorescent or ^{64}Cu -labeled SAV-probe, reflecting the absence of apoptotic cells due to their physiological removal from the tumor tissue.

Timing of the pretargeting protocol

Optimizing the detection of apoptosis and image contrast following the pretargeting protocol requires optimizing the timing of the individual steps. The first interval considered in this study was the timing of the pretargeting step, i.e. the time required after PDT to allow for optimal expression of apoptosis. Our in vivo data show that apoptosis pretargeting by biotinylated anxV should be done early after PDT (Table IV.1). Thus all subsequent studies were done following this timing sequence, i.e. pretargeting immediately after PDT, followed 2 h later by the avidin-chase and 4 h post-PDT by ^{64}Cu -DOTA-biotin-SAV injection. The selected timing of the avidin-chase to reduce circulating biotin derivatives was based on literature data [7-9, 19, 39-41]. However in clinical practice, both protein doses and delays between administrations need to be optimized. For example, the delay between the avidin-chase and tracer injection could probably be reduced from 2 h down to 30 min [23].

The time lapse after tracer injection to optimize image quality depends to a large extent on the rapidity of tracer removal from the blood pool. The blood clearance curve revealed that ~3 h are needed to allow for >90% of the tracer to be eliminated from the blood pool (Fig. IV.5). Evaluation of the tissue distribution of the ^{64}Cu -SAv complex at this time point showed, apart from the distinct differences in tumor uptake, little difference in the overall distribution between PDT-treated animals and the reference group. The kidneys showed the highest ^{64}Cu uptake in accordance with elimination of the ^{64}Cu -DOTA-biotin-SAv largely via the urinary pathway. Similar observations have been made with radiolabeled anxV and different hypotheses have been advanced to explain the preferred kidney uptake. A potential presence of externalized PS in the kidneys was ruled out by Blankenberg et al. [42]. Their studies revealed that different anxV analogs with different efficacies to detect natural apoptosis in the liver and spleen, shared the same kidney uptake values.

The presence of significant concentrations of ^{64}Cu -DOTA-biotin-SAv in the non-illuminated muscle surrounding the treated tumor together with the decrease ($P < 0.05$) in tracer activity at the reference tumor following PDT (0.45 to 0.11 %ID/g) suggests a systemic response to PDT (Table IV.2). The induction of a systemic immune response following PDT is well documented and could explain these discrepancies [28, 43]. Changes in tumor-to-blood ratios may also result from changes in the tumor vascular permeability and perfusion (Table IV.2). It is well known that PDT strongly affects tumor blood flow due to the release of vasoactive components and that the intensity of this phenomenon directly relates to the hydrophobicity of the photosensitizer [27, 28].

PET imaging of apoptosis

PET imaging of tumor bearing animals treated with ^{64}Cu -DOTA-biotin-SAv following the three-step pretargeting protocol showed a similar tracer uptake pattern as predicted from the biodistribution studies. The kidneys were well delineated on all images while ^{64}Cu uptake in the liver, heart and lungs was less prominent (Fig. IV.6). The rapid ^{64}Cu -clearance via the urinary pathway was evident from the high radioactivity level of the bladder as early as 30 min post tracer-injection. The presence of apoptotic cells in the illuminated tumors was readily visible on the early scans taken 30 min after tracer administration and was still apparent on scans taken 24 h post-injection. On the other hand, little or no activity could be detected in the reference tumor.

To optimize image contrast after in vivo PDT following the three-step ^{64}Cu pretargeting method, it is important to reduce blood background radioactivity via the avidin-chase. Omission of this step resulted in severe loss of image contrast (Fig. IV.6). The optimal time interval between administration of ^{64}Cu -DOTA-biotin-SAv and PET imaging varies with the efficacy of the tumor treatment protocol (Fig. IV.7). After the more aggressive ZnPcS_2 -PDT treatment the highest tumor uptake was observed at ~ 7 h post-PDT. In contrast, after AlPcS_2 -PDT a period of 10-11 h post-PDT was required for optimal contrast of apoptosis reflecting a delayed apoptotic response.

In comparison with direct imaging of apoptosis with $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Hynic-anxV using SPECT, the indirect pretargeting procedure promises to be more flexible in that the initial pretargeting step could be repeated to optimize tracer uptake by the target tissue. Also, the subsequent avidin-chase increases detection specificity by increasing tracer availability and reducing blood background. Other advantages of PET over SPECT include the higher spatial resolution that can be attained with the former, resulting in better image quality.

Obviously, the three-step protocol is more laborious as compared to direct labeling of anxV. Furthermore, both avidin and SAV administration could provoke an immunological response although this problem can be solved through the use of PEGylated [44] or site-directed mutagenesis of the proteins [45]. Finally, the readily availability of ^{99m}Tc vs. the limited access to positron emitting radioisotopes can be construed as a general disadvantage of PET at the present time. Overall, with the improved availability of PET radio-tracers in the foreseeable future, the combined advantages of the pre-targeting PET protocol could provide a valid alternative to SPECT for clinical imaging of apoptosis.

Conclusion

In this study we demonstrated the efficacy of a three-step pretargeting procedure for PET imaging of apoptosis with a ^{64}Cu -SAV complex. The procedure offers the flexibility of adapting time intervals between the various steps to accommodate selected treatment protocols. Thus intervals between clinical interventions, pretargeting with non-radioactive biotinylated anxV, the avidin-chase and administration of the radiopharmaceutical can all be modulated to optimize the detection of apoptosis. Although the radiation properties of ^{64}Cu (40% β^- , 19% β^+) are not appropriate for human diagnostic applications, substitution of ^{64}Cu for ^{60}Cu ($t_{1/2} = 23$ min, 93% β^+) or ^{61}Cu ($t_{1/2} = 3.4$ h, 62% β^+) will render this radiopharmaceutical suitable for human PET scans to follow apoptosis in the treatment of cancer and many other medical conditions.

Acknowledgements. This work was supported by the Canadian Institutes for Health Research (CIHR grants MOP-44065 and MOP-15348). JEvL is the holder of the Jeanne and J.-Louis Lévesque Chair in Radiobiology.

Références

1. Derradji H, Baatout S. Apoptosis: a mechanism of cell suicide. *In Vivo* 2003; 17:185-192.
2. Lahorte CMM, Vanderheyden JL, Steinmetz N, Van de Wiele C, Dierckx RA, Slegers G. Apoptosis-detecting radioligands: current state of the art and future perspectives. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2004; 31:887-919.
3. Boersma HH, Kietselaer BLJH, Stolk LML, Bennaghmouch A, Hofstra L, Narula J, et al. Past, present, and future of annexin A5: From protein discovery to clinical applications. *J Nucl Med* 2005; 46:2035-2050.
4. Blankenberg FG, Tait J, Ohtsuki K, Strauss HW. Apoptosis: the importance of nuclear medicine. *Nucl Med Commun* 2000; 21:2410250.
5. Kemerink GJ, Liu X, Kieffer D, Ceysens S, Mortelmans L, Verbruggen AM, et al. Safety, biodistribution and dosimetry of ^{99m}Tc -HYNIC-annexin V, a novel human recombinant annexin V for human application. *J Nucl Med* 2003; 44:947-952.
6. Belhocine T, Steinmetz, N, Li C, Green A, Blankenberg FG. The imaging of apoptosis with the radiolabeled annexin V: optimal timing for clinical feasibility. *Technol Cancer Res Treat* 2004; 3:23-32.
7. Lahorte CM, van de Wiele C, Bacher K, van den Bossche B, Thierens H, van Belle S, et al. Biodistribution and dosimetry study of ^{123}I -rh-annexin V in mice and humans. *Nucl Med Commun* 2003; 24:871-880.
8. Collingridge DR, Glaser M, Osman S, Barthel H, Hutchinson OC, Luthra SK, et al. In vitro selectivity, in vivo biodistribution and tumor uptake of annexin V radiolabelled with a positron emitting radioisotope. *Br J Cancer* 2003; 89:1327-1333.

9. Subbarayan M, Hafeli UO, Feyes DK, Unnithan J, Emancipator SN, Mukhtar H. A simplified method for preparation of ^{99m}Tc -annexin V and its biologic evaluation for in vivo imaging of apoptosis after photodynamic therapy. *J Nucl Med* 2003; 44:650-656.
10. Boersma HH, Liem IH, Kemerink GJ, Thimister PW, Hofstra L, Stolk LM, et al. Comparison between human pharmacokinetics and imaging properties of two conjugation methods for ^{99m}Tc -annexin A5. *Br J Radiol* 2003; 76:553-560.
11. Glaser M, Collingridge DR, Aboagye EO, Bouchier-Hayes L, Hutchinson OC, Martin SJ, et al. Iodine-124 labelled annexin-V as a potential radiotracer to study apoptosis using positron emission tomography. *Appl Radiat Isotopes* 2003; 58:55-62.
12. Li C, Wen X, Wu Q, Wallace S, Charnsangavej C, Stachowiak AM, et al. Imaging taxane-induced tumor apoptosis using PEGylated, ^{111}In -labeled annexin V. *J Nucl. Med* 2004; 45: 108-115.
13. Yade KJ, Eary JF, Tait JF, Grierson JR, Link JM, Lewellen B, et al. Evaluation of ^{18}F -Annexin V as a PET imaging agent in an animal model of apoptosis. *J Nucl. Med* 2005; 46: 658-666.
14. Gonzalez M, Bagatolli LA, Echabe I, Arrondo JL, Argarana CE, Cantor CR, et al. Interaction of biotin with streptavidin. Thermostability and conformational changes upon binding. *J Biol Chem* 1997; 272:11288-11294.
15. Gonzalez M, Argarana CE, Fidelio GD. Extremely high thermal stability of streptavidin and avidin upon biotin binding. *Biomol Eng* 1999; 16:67-72.
16. Selivanov V, Picard Y, Cadorette J, Rodrigue S, Lecomte R. Detector response models for statistical iterative image reconstruction in high resolution PET. *IEEE Trans Nucl Sci* 2000; 47:1168-1175.

17. van Engeland M, Nieland LJW, Ramaekers FCS, Schutte B, Reutelingsperger CPM. Annexin-V affinity assay: A review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* 1998; 31:1-9.
18. Schrevers A, van Nassauw L, Harrisson F. Histochemical demonstration of apoptotic cells in the chicken embryo using annexin V. *Histochem J* 1998; 30:917-922.
19. Sakahara H, Saga T. Avidin-biotin system for delivery of diagnostic agents. *Adv Drug Deliv Rev* 1999; 37:89-101.
20. Boerman OC, van Schaijk FG, Oyen WJ, Corstens FH. Pretargeted radioimmuno-therapy of cancer: progress step by step. *J Nucl Med* 2003; 44:400-411.
21. Goldenberg DM. Targeted therapy of cancer with radiolabeled antibodies. *J Nucl Med* 2002; 43:693-713.
22. van den Eijnde SM, Boshart L., Baehrecke EH, de Zeeuw CI, Reutelingsperger CPM, Vermeij-Keers C. Cell surface exposure of phosphatidylserine during apoptosis is phylogenetically conserved. *Apoptosis* 1998; 3:9-16.
23. Zhang M, Sakahara H, Yao Z, Saga T, Nakamoto Y, Sato N, et al. Intravenous avidin chase improved localization of radiolabeled streptavidin in intraperitoneal xenograft pretargeted with biotinylated antibody. *Nucl Med Biol* 1997; 24:61-64.
24. Sharman WM, Allen CM, van Lier JE. Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. *Drug Disc Today* 1999; 4:507-517.
25. Korbelik M, Cecic I. Mechanism of tumor destruction by photodynamic therapy. In Nalwa HS, ed. *Handbook of Photochemistry and Photobiology*. Stevenson Ranch, CA: American Scientific Publishers; 2003; p. 39-77.
26. Oleinick NL, Morris RL, Belichenko I. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how, *Photochem Photobiol Sci* 2002; 1:1-21.

27. Fingar VH, Wieman TJ, Karavolos PM, Doak KW, Ouellet R, van Lier JE. The effects of photodynamic therapy using differently substituted zinc phthalocyanines on vessel constriction, vessel leakage and tumor response. *Photochem Photobiol* 1993; 58:251-258.
28. Chan WS, Brasseur N, La Madeleine C, Ouellet R, van Lier JE. Efficacy and mechanism of aluminium phthalocyanine and its sulphonated derivatives mediated photodynamic therapy on murine tumours. *Eur J Cancer* 1997; 33:1855-1859.
29. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-685.
30. Ali H, Langlois R, Wagner R, Brasseur N, Paquette B, van Lier JE. Biological activities of phthalocyanines-X: syntheses and analyses of sulfonated phthalocyanines. *Photochem Photobiol* 1988; 47:713-717.
31. Lewis MR, Kao JY, Anderson AL, Shively JE, Raubitschek A. An improved method for conjugating monoclonal antibodies with N-hydroxysulfosuccinimidyl DOTA. *Bioconjugate Chem* 2001; 12:320-324.
32. Okamoto K, Mizuno M, Nakahara N, Natsume A, Yoshida J, Mori T, et al. Process of apoptosis induced by TNF- α in murine fibroblast Ltk-cells: Continuous observation with video enhanced contrast microscopy. *Apoptosis* 2002; 7:77-86.
33. Zeisler SK, Pavan RA, Orzechowski J, Langlois R, Rodrigue S, van Lier JE. Production of ^{64}Cu on the Sherbrooke TR-PET cyclotron. *J Radioanal Nucl Chem* 2003; 257:175-177.
34. McCarthy DW, Shefer RE, Klinkowstein RE, Bass LA, Margeneau WH, Cutler CS, et al. Efficient production of high specific activity ^{64}Cu using a biomedical cyclotron. *Nucl Med Biol* 1997; 24:35-43.

35. Sabatino G, Chinol M, Paganelli G, Papi S, Chelli M, Leone G, et al. A new biotin derivative-DOTA conjugate as a candidate for pretargeted diagnosis and therapy of tumors. *J Med Chem* 2003; 46:3170-3173.
36. Axworthy DB, Reno JM, Hylarides MD, Mallett RW, Theodore LJ, Gustavson LM, et al. Cure of human carcinoma xenografts by a single dose of pretargeted yttrium-90 with negligible toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:1802-1807
37. Bissonnette N, Wasyluk B, Hunting DJ. The apoptotic and transcriptional transactivation activities of P53 can be dissociated. *Biochem Cell Biol* 1997; 75:351-358.
38. Lapointe D, Brasseur N, Cadorette J, La Madeleine C, Rodrigue S, van Lier JE, et al. High-resolution PET imaging for in vivo monitoring of tumor response after photodynamic therapy in mice. *J Nucl Med* 1999; 40:876-882.
39. Gruaz-Guyon A, Raguin O, Barbet J. Recent advances in pretargeted radioimmunotherapy. *Curr Med Chem* 2005; 12: 319-338.
40. Mirallié E, Sai-Maurel C, Faivre-Chauvet AF, Regenet N, Chang C-H, Goldenberg D.M., et al. Improved pretargeted delivery of radiolabelled hapten to human tumour xenograft in mice by avidin chase of circulating bispecific antibody. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2005; 32:901-909.
41. Kobayashi H, Sakahara H, Endo K, Hosono M, Yao ZS, Toyama S, et al. Comparison of the chase effects of avidin, streptavidin, neutravidin, and avidin-ferritin on a radio-labeled biotinylated anti-tumor monoclonal antibody. *Jpn J Cancer Res* 1995; 86:310-314.
42. Blankenberg FG, Smith C, Gibson DF, Tait JF. Different factors control renal versus hepatic and splenic uptake of Annexin V. *J Nucl Med* 2004; 45:149-150.

43. van Duijnhoven FH, Aalbers RI, Rovers JP, Terpstra OT, Kuppen PJ. The immunological consequences of photodynamic treatment of cancer, a literature review. *Immunobiology* 2003; 207:105-113
44. Veronese FM, Pasut G. PEGylation, successful approach to drug delivery. *Drug Discovery Today* 2005; 10:1451-1458.
45. Meyer DL, Schultz J, Lin Y, Henry A, Sanderson J, Jackson JM, et al. Reduced antibody response to streptavidin through site-directed mutagenesis. *Protein Sci* 2001; 10:491-503.

V. DISCUSSION

V.1 Relation entre l'hydrophobie d'une série de dérivés du ZnPcS_3C_n ; potentiel photodynamique et mécanismes de mort cellulaire.

V.1.1 Raisons motivant la synthèse du ZnPcS_3

La présence de groupements sulfonates hydrophiles à la périphérie des Pcs augmente leurs solubilités dans l'eau. Le dérivé avec deux sulfonates adjacents lui attribue une structure chimique particulière qui lui confère une solubilité accrue tandis que l'autre partie portant deux unités non substituées de benzimidazole lui attribue une hydrophobie indispensable pour pénétrer la membrane plasmique. L'amphiphilique ZnPcS_2 s'accumule très rapidement dans la cellule et montre une phototoxicité optimale mais sa synthèse forme de nombreux isomères. Les MPcS_2 sont en effet difficiles à préparer en tant que composés isomériques simples.

En fait, il y a 16 isomères possibles. La purification de ces dérivés en un seul isomère est fastidieuse. L'équipe de Brasseur a évalué la phototoxicité de certaines des fractions isomériques et a démontré une variation importante entre les fractions analysées (Brasseur et al., 1987). Puisque l'utilisation clinique d'un mélange complexe d'isomère n'est pas souhaitable, nous désirons préparer un PcS possédant des propriétés amphiphiliques similaires au ZnPcS_2 , mais comme produit isomérique simple. L'asymétrique ZnPcS_3 pourrait nous permettre d'atteindre nos objectifs. Le troisième groupement sulfonate détruit le caractère amphiphile et augmente l'hydrophilie globale du produit, mais permet une obtention facile d'un isomère pur. De plus, une simple addition d'un substituant sur la dernière unité benzimidazole non substituée pourrait neutraliser l'augmentation d'hydrophilie relative à la présence du groupement sulfonate additionnel.

V.1.2 Modulation de l'hydrophobie des ZnPc_3

La seule méthode permettant de moduler l'hydrophobie d'un Pc consiste à introduire des substituants hydrophobes ou hydrophiles à la périphérie du macrocycle. L'efficacité de cette approche est démontrée dans un grand nombre d'articles scientifiques (Brasseur et al., 1999; Urizzi et al., 2001; Allen et al., 1999). L'ajout de chaînes latérales d'acide caproïque a permis de modifier l'hydrophobie de AlPcS_4 et de favoriser l'accumulation de ces dérivés dans les tissus cibles. Kudrevich et ses collaborateurs ont confirmé l'existence d'une relation entre les différences de phototoxicité et les modifications dans l'hydrophobie résultant de l'ajout de différents substituants sur le ZnPcS_3 (Kudrevich et al., 1997). Cette modification produisait des effets bénéfiques sauf pour des substituants encombrants. Leurs résultats permettraient d'envisager l'existence d'une zone précise d'hydrophobie conduisant à une activité photodynamique optimale. Ce même laboratoire a aussi obtenu des résultats intéressants en couplant le LDL avec AlPcS_4 (Urizzi et al., 2001; Sharman et al., 2004). Ce conjugué démontrait une meilleure pénétration de la bicouche lipidique de la membrane plasmique par l'intermédiaire de longues chaînes alkyles par rapport à la forme non conjuguée.

Allen et al. ont récemment modulé avec succès l'hydrophobie de l' AlPcS_4 par la formation d'un lien sulfamide entre un des groupements sulfonates et des chaînes alkyles d'une longueur variable (Allen et al., 2002). Rancan et al. ont aussi observé une influence des propriétés physicochimiques découlant de la présence de différents substituants sur l'incorporation et la localisation intracellulaire des PS, tout en spécifiant qu'une localisation préférentielle dans des organelles cibles déterminerait le mécanisme de la mort de cellules après TPD (Rancan et al., 2005). L'hydrophobie favorise l'accumulation cellulaire des PS et encore une fois on remarque que l'amphiphilie augmente le pouvoir photodyna-

mique des PS. En ce basant sur ces faits, une amélioration appréciable du potentiel photodynamique du ZnPcS_3 peut être obtenue en remplaçant l'hydrogène périphérique par une chaîne alkyle de longueur variable dans un but précis de trouver une alternative intéressante à l'utilisation de ZnPcS_2 .

V.1.3 Évaluation du niveau d'hydrophobie des différents ZnPcS_3C_n

La structure chimique des PS détermine en grande partie son hydrophobie qui est un facteur important pour établir leur potentiel pharmacologique et toxicologique. Pour déterminer l'hydrophobie des représentants ZnPcS_3C_n , deux méthodes reconnues ont été sélectionnées, le coefficient de partage (P) et le temps de rétention (R_t). La première se définit par le logarithme de P et mesure la préférence du PS à se retrouver dans un solvant organique ou aqueux. Tandis que la seconde évalue la capacité du PS à créer des liaisons hydrophobes avec la phase stationnaire (Berthod et Carda-Broch, 2004).

Dans un système liquide, un PS hydrophobe se retrouvera en plus forte concentration dans un solvant organique, ce qui donnera un rapport de distribution octanol-eau, $P > 1$ donc un logarithme P ou un coefficient de partition positif. Tandis qu'un produit hydrophile aura une concentration plus importante dans l'eau, une valeur $P < 1$ et un coefficient de partition négatif. Donc on peut déterminer le niveau d'hydrophobie en établissant une échelle variant d'une valeur fortement négative à une valeur de plus en plus positive.

En chromatographie liquide de haute performance en phase inverse (HPLC, C18), les chaînes alkyles (C18) confère à la silice un caractère très hydrophobe. Si la phase mobile est très polaire (donc très peu hydrophobe), certaines molécules hydrophobes vont établir des interactions avec la phase stationnaire et ainsi être adsorbées. En augmentant graduellement la concentration en solvant organique (apolaire) de la phase mobile, à une

concentration donnée l'hydrophobie de la phase mobile devient plus importante que celle de la phase stationnaire ayant comme effet de provoquer la désorption et l'élution des molécules hydrophobes. Plus un soluté est hydrophobe, plus il sera retenu au niveau de la phase solide stationnaire et exigera un solvant de nature organique. À l'inverse, plus un soluté est hydrophile, plus il sera entraîné par un solvant aqueux dans la phase mobile liquide. La progression de l'hydrophobie s'exprimera en terme d'augmentation du temps requis pour éluer chaque produit.

V.1.4 Méthodes usuelles mesurant le niveau d'hydrophobie

Même si les principes de ces méthodes sont très différents, les deux donnent une mesure des propriétés lipophiliques des colorants. La figure V.1 démontrent que l'augmentation du niveau d'hydrophobie est conforme aux principes directeurs des deux méthodes, soit en diminuant la négativité de la valeur de P (A) ou en augmentant la valeur du temps de rétention (B). Ces derniers paramètres sont représentatifs des propriétés hydrophobes/hydrophiles de ces colorants. L'hydrophobie de tous les dérivés ZnPcS_3C_n est supérieure à celle du parent (ZnPcS_3), donc l'ajout d'une chaîne de carbones de plus en plus longue à la périphérie du macrocycle ZnPcS_3 constitue un moyen efficace d'augmenter l'hydrophobie des dérivés ZnPcS_3C_n .

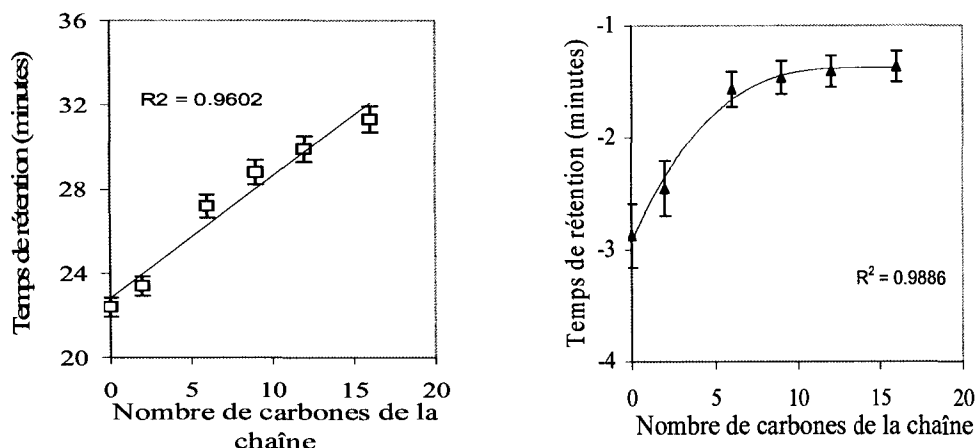


Figure V.1: Variation du $\log(p)$ (A) et le temps de rétention (B) en fonction du nombre de carbones de la chaîne alkynyle.

De plus, la variation du $\log(P)$ en fonction du temps de rétention montre une relation linéaire (figure II.1). Les deux méthodes reflètent une augmentation véritable de l'intensité de l'hydrophobie qui tient compte des différences structurales des dérivés donnés.

V.1.5 Principaux effets de l'hydrophobie

L'hydrophobie influence indirectement l'activité photodynamique du PS en favorisant son agrégation dans les milieux biologiques et en privilégiant certaines interactions avec les protéines ou les lipides présents dans son environnement. La tendance des Pcs à se retrouver sous une forme agrégée est fortement influencée par la nature des substituants périphériques. Donc l'hydrophobie des PS détermine les tendances pour agréger, qui à leur tour pourraient influencer la cinétique d'internalisation, la localisation intracellulaire et la capacité pour produire l' $^1\text{O}_2$. De ce fait, une augmentation d'hydrophobie se traduit généralement par une augmentation de la formation d'agrégats dans une manière dépendante du milieu. Un indice utile pour déterminer l'effet de l'hydrophobie serait de mesurer cette agrégation. Celle-ci est facilement déduite des spectres électroniques par un déplacement

de 30-50 nm de la bande d'absorption autour de 675 nm (bande Q) pour produire une bande d'absorption autour de 630 nm plus large mais moins intense (15). Un second indice aussi valable serait de déterminer la réduction de la capacité de produire de l' $^1\text{O}_2$ (Wagner et al., 1987; Kessel et al., 1987; Spikes et Brommer, 2006).

Après solubilisation, les PS se distribuent sous deux formes dépendamment des interactions avec les molécules du solvant; une forme monomérique et une agrégée. Dans un solvant organique, on retrouve majoritairement la forme organique (méthanol) tandis que dans un solvant aqueux (PBS) la forme agrégée domine. L'ajout de protéines provoque une destruction des agrégats en s'intercalant entre les couches de ZnPcs. Dans le PBS ou le milieu de culture contenant 1% de protéines (FBS), l'agrégation demeure élevée pour tous les dérivés essayés (tableau II.1). Ces données montrent que le parent le plus hydrophile ZnPcS_3 forme le moins d'agrégats. L'ajout de 55% de protéines cause une augmentation de la concentration de monomère à ~20%. Seulement le $\text{ZnPcS}_3\text{C}_{16}$ est moins affecté par la présence de protéines supplémentaires et la concentration de monomère reste faible (6%). Donc une hydrophobie élevée provoque la formation d'agrégats compacts plus volumineux qui empêchent les protéines de pénétrer. Un résultat intéressant concerne la réaction de ZnPcS_2 à la présence d'une concentration élevée de protéines (55%). ZnPcS_2 réagit fortement avec les protéines et provoque une augmentation de la concentration de monomère (51,4%) équivalent à 5 fois celle détectée dans le PBS (9,6%) et retrouvant celle présente dans le méthanol (58,8%). Des cinq milieux étudiés, le tampon aqueux fortifié avec 55% de FBS imite de plus près l'environnement intracellulaire, suggérant qu'un procédé de monomérisation similaire arrive au niveau cellulaire. Ceci implique que cette amphiphilie du PS joue un rôle important dans la détermination des proportions monomère/agrégat optimales au site cible, contribuant aux effets phototoxiques désirés.

Durant l'illumination, les PS agrégés dispersent leur énergie par la conversion interne à l'état fondamental au lieu de procéder à la formation de triplet avec la production d' $^1\text{O}_2$ subséquente (Rosenthal et al., 1988). La détection de la production d'hydroperoxide (HPPI) du L-tryptophane permet une mesure indirecte de la capacité de générer de $^1\text{O}_2$. Dans le PBS, la production d'hydroperoxide (HPPI) par nos ZnPcS augmente proportionnellement avec la concentration de monomère (tableau II.1). Le ZnPcS plus lipophile forme plus facilement des agrégats en solution aqueuse réduisant ainsi son activité photochimique. Margaron et al. ont rapporté des conclusions similaires pour expliquer la faible internalisation de leur composé le plus lipophile, un ZnPc tétraiodiné (Margaron et al., 1996). L'augmentation de la longueur des chaînes périphériques ou latérales facilitent l'agrégation des ZnPcS₃ et occasionne une perte de leur capacité à produire $^1\text{O}_2$. Un phénomène qui est confirmé par la réduction de leur capacité à générer les hydroperoxides (HPPI) caractéristiques de la photooxydation du L-tryptophane (tableau II.1). Quand les dérivés de Pc ont été solubilisés dans 1% crémorphore EL, la formation de HPPI de tous les ZnPcS₃C_n dérivés ont surpassé celle de la référence AlOHPCs₄ (tableau II.1) et ont donné des rendements semblables en $^1\text{O}_2$.

L'encombrement stérique provoqué par la présence d'une longue chaîne de carbones ou d'un groupement volumineux peut aussi contribuer à la réduction de l'incorporation cellulaire et à la perte de phototoxicité. Rosenthal et al. ont attribué l'absence significative d'accumulation intracellulaire du produit lipophile, ZnPc tetraneopentoxy, à l'encombrement stérique dû à l'espace important occupé par les groupements neopentoxy (Rosenthal et al., 1988). Nous avons précédemment démontré que l'addition de longues chaînes axiales d'hydrocarbure au naphthalocyanine de silicium augmente son hydrophobie, mais aussi

provoque un encombrement stérique réduisant son incorporation cellulaire et son pouvoir phototoxique (Brasseur et al., 1994).

V.1.6 Impact de la structure chimique sur la localisation intracellulaire des

ZnPcS₃C_n

La structure chimique influence à un certain niveau la localisation intracellulaire des PS en favorisant ou défavorisant leur internalisation. La membrane plasmique sert de barrière pour plusieurs substances. En effet, la région hydrophobe comprise entre la bicouche lipidique constitue une barrière infranchissable pour les substances polaires ou possédant plus de deux charges nettes positives ou négatives. L'eau, les molécules neutres et apolaires peuvent traverser la bicouche lipidique. La structure chimique du ZnPcS₂ favorise son passage à travers la membrane plasmique. Mais la présence d'un troisième groupement sulfonate dans le ZnPcS₃ rend sa charge nette négative et augmente significativement son hydrophilie. Ce PS préférera demeurer dans un milieu aqueux et traversera plus lentement la membrane plasmique. L'ajout de chaînes lipophiles a pour but de rééquilibrer ce changement et favoriser le transport intermembranaire. Cependant la dimension spatiale du produit peut aussi créer des interférences. Plus le produit est volumineux, plus il occasionne un encombrement stérique qui risque d'empêcher ce produit de traverser les espaces entre les lipides ou par les ouvertures membranaires.

Les produits cationiques sont reconnus pour s'accumuler spécifiquement dans les mitochondries tandis que les produits anioniques se distribuent plus aléatoirement dans la cellule. De plus en plus, on reconnaît une influence non négligeable de l'hydrophobie du composé sur la localisation intracellulaire. Un produit hydrophile se concentre plus dans les lysosomes et un produit hydrophobe se retrouve plus souvent lié à la membrane plas-

mique. En examinant tous les résultats de colocalisation, les dérivés ZnPcS_3C_n se localisent principalement dans les mitochondries et l'appareil de Golgi (Figure II.4B à E). Cette localisation au niveau de plusieurs organelles (non spécifique) est souvent observée pour un PS avec deux charges négatives et se traduit par une présence faible dans toutes les structures testées.

Certaines différences ont été observées entre les ZnPcS . Les dérivés plus amphiphiles ZnPcS_3C_6 et ZnPcS_3C_9 co-localisent plus fortement avec la sonde mitochondriale. Les dérivés ZnPcS_3 portant des chaînes lipophiliques plus courtes ou plus longues montrent une diminution significative de leur présence dans les structures intracellulaires. Nous avons aussi détecté des similitudes entre ZnPcS_2 , ZnPcS_3C_6 et ZnPcS_3C_9 . Les trois ZnPcS se localisent dans les lysosomes, les mitochondries et le Golgi mais leur accumulation dans les noyaux des cellules reste très négligeable. De plus, nous avons détecté une distribution typique dans la membrane plasmique indiquant un apport probable de l'endocytose comme mécanisme d'internalisation des Pcs. La présence de PS dans les lysosomes pourrait être bénéfique en fournissant une autre voie active responsable d'une partie de la réponse photodynamique générale. L'augmentation de l'hydrophobie des ZnPcS_3C_n provoque une colocalisation sous une forme plutôt ponctiforme que diffuse. Cette forme de distribution accompagnée d'une présence dans les lysosomes et dans l'appareil de Golgi indiquerait un apport de l'endocytose comme moyen d'internalisation de nos ZnPcS .

V.1.7 Relation entre la structure chimique et l'activité photodynamique des

ZnPcS_3C_n

Nos connaissances soutiennent que les propriétés amphiphiles des PS jouent un rôle significatif dans leur efficacité photodynamique (van Lier et Spikes, 1989). Nous avons rapporté précédemment qu'en augmentant le nombre de groupements sulfonates sur un MPcS, provoque une diminution de la photocytotoxicité, sous des conditions *in vitro* et *in vivo*, qui coïncide avec la diminution de l'incorporation cellulaire (Brasseur et al., 1987). Les MPcS₂ portant deux groupes sulfonates sur des benzyles adjacents sont les dérivés les plus photoactifs. D'autre part, il a été rapporté que les produits amphiphiles interagissent avec la bicouche lipidique des membranes plasmiques (Chatelier et al., 1985), facilitant ainsi leur transport dans la cellule (Paquette et al., 1988). D'autre part, ces mêmes propriétés amphiphiles favoriseraient la formation des liaisons efficaces avec les lipoprotéines de base densité (LDL), qui sont impliquées dans le transport des porphyrines dans les tissus tumoraux (Kessel et al., 1987 ; Sharman et al., 2004). Les propriétés amphiphiles des ZnPcS correspondent fortement à leur incorporation cellulaire et leur potentiel photodynamique (Margaron et al, 1996). Nos données actuelles confirment ce fait. L'ajout d'une chaîne lipophile latérale d'hydrocarbures à ZnPcS₃ améliore l'incorporation cellulaire (tableau II.2). Cependant l'addition de très longues chaînes, par ex. $n > 9$ pour ZnPcS₃C_n, cause une diminution de l'incorporation cellulaire fournissant une relation parabolique entre l'incorporation cellulaire en fonction du temps de rétention inversée par rapport à celle observée pour la phototoxicité versus ce même temps de rétention (figure II.3). Ceci est particulièrement évident après une période d'incubation de 24 heures (figure II.3B).

Une comparaison des valeurs relatives de LD₉₀ des ZnPcS₃C_n avec celles d'incorporation cellulaire, après les deux périodes d'incubation de 1 h et de 24 h, révèle une régres-

sion plutôt linéaire avec une photocytotoxicité maximale correspondant à une incorporation cellulaire plus élevée (figure II.5). Ce phénomène est particulièrement évident après la courte période d'incubation de 1 heure. Ceci confirme que les variations dans la phototoxicité entre les ZnPcS_3C_n ne peuvent pas être expliquées simplement par les différences de localisation ou d'incorporation cellulaire. D'autres facteurs peuvent jouer des rôles cruciaux comme le taux de production d' $^1\text{O}_2$, les interactions entre les différentes organelles dans la cellule, l'étendue de dommages, les changements dans la perméabilité des diverses structures membranaires, la cinétique d'internalisation des ZnPcs , etc. Nos données suggèrent fortement que les variations dans les taux d'internalisation et la distribution intracellulaire de la drogue au moment de l'illumination soient responsables des différences dans le potentiel photodynamique des ZnPcS_3C_n .

V.2 Activité photodynamique d'une séries de dérivés du ZnPcS_3C_n : rôle de la membrane plasmique

V.2.1 Accumulation des dérivés ZnPcS_3C_n dans la membrane plasmique

Nos expériences de colocalisation confirment la présence des dérivés ZnPcS_3C_n dans les structures internes ou périphériques de la membrane plasmique (Article 2, Figures III.1 et III.2). Leur présence à la périphérie de la membrane plasmique semble être favorisée pour la majorité des ZnPcS et paraît après une période d'incubation courte (1 h). Même s'il existe des différences évidentes révélant l'influence de l'hydrophobie des ZnPcS sur la localisation dans la membrane plasmique, ces données sont difficiles à interpréter et ce n'est pas le seul facteur à considérer pour élucider l'importance observée de la structure chimique sur l'activité photodynamique pour de courts temps d'incubation.

V.2.2 Effet de la structure chimique sur la distribution membranaire des ZnPcS_3C_n

En observant attentivement l'internalisation progressive du marqueur membranaire, certaines différences peuvent être attribuées à la structure chimique. L'amphiphilie de ZnPcS_2 expliquerait son internalisation plus diffuse et progressive, permettant sa détection à l'intérieur de la membrane plasmique après une incubation de 24 heures. L'hydrophilie de ZnPcS_3 limite sa présence à la périphérie de la membrane plasmique et restreint la progression du marqueur. Pour sa part, l'hydrophobie développe un profil de localisation caractérisé par la formation de taches plus ou moins imposantes à des endroits localisés dans la membrane plasmique des cellules. Ce fait appuie l'hypothèse soulevée dans le premier article de cette thèse concernant une implication possible de l'endocytose durant l'internalisation des mêmes ZnPcS en fonction de leur hydrophobie. La réalisation d'études supplémentaires est nécessaire pour certifier l'apport de ce mode d'internalisation soit par immunofluorescence ou en identifiant les molécules de transport et les récepteurs impliqués.

V.2.3 Dommages induits à la membrane plasmique durant la TPD

Les propriétés spécifiques de la sonde TMA-DPH permettent de vérifier l'intégrité de la membrane plasmique. Une membrane plasmique fonctionnelle est imperméable à cette sonde, cette dernière s'associe rapidement à la périphérie de la membrane plasmique et s'internalise progressivement avec l'augmentation du temps d'incubation seulement en présence d'une concentration externe en excès (Illinger et Kuhry, 1994; Coupin et al., 1999). Un enlèvement du TMA-DPH excédentaire arrête son internalisation. On peut facilement enlever la partie du TMA-DPH liée à la surface externe de la membrane par de

courts lavages successifs dans du tampon et déterminer la fraction internalisée (Coupin et al., 1999). De plus, les propriétés particulières de cette sonde permettent de suivre la progression de son internalisation. L'intensité de la fluorescence augmente régulièrement en fonction du temps d'incubation. Une modification de la linéarité dans une population cellulaire constante indique une dysfonction de la membrane plasmique.

Les courbes de la cinétique d'internalisation totale (Article 2, figure III.2 A et B graphique droit) montrent que la présence de ZnPcS_3C_n n'affecte pas le fonctionnement de la membrane plasmique. La perte de linéarité observée après illumination de 5 minutes indique un endommagement de la membrane plasmique facilitant l'internalisation de la sonde. Les variations du taux initial de ces courbes dépendent du type de ZnPcS et révèlent une implication possible de la structure chimique sur l'intensité des dommages induits. Les résultats de la figure III.4 (Article 2) confirment que la nature amphiphile des ZnPcS détermine leur capacité à induire la perte d'intégrité membranaire surtout pour des courts temps d'incubation. Une incubation prolongée réduit l'influence de l'hydrophobie car tous les ZnPcS induisent des dommages à la membrane plasmique.

Le profil des cinétiques de la fraction internalisée présenté à la figure III.3 de l'article 2 confirme que la TPD induit bien une augmentation de la concentration de TMA-DPH dans la bicouche lipidique et supporte l'influence de l'hydrophobie des ZnPcS . À la différence de l'internalisation totale, le taux initial de ces courbes représente une idée plus juste des fonctions de la membrane en mesurant directement la concentration internalisée et en minimisant l'importance des événements reliés au mécanisme endocytaire ou exocytaire.

V.2.4 Implication de la membrane plasmique dans la relation entre la structure chimique et l'activité photodynamique

Pour quantifier les dommages induits par la TPD à la membrane plasmique nous avons utilisé le taux d'internalisation du marqueur endocytaire TMA-DPH comme paramètre (Article 2, figure III.3). Étant donné la zone de réaction très limitée de l¹O₂ généré pendant la TPD, nous pouvons supposer qu'une augmentation de la vitesse d'internalisation du TMA-DPH après TPD correspond avec les dommages de la membrane et la localisation de ZnPcS. La vitesse initiale d'internalisation du TMA-PDH dérivée des courbes de cinétique de la fraction internalisée peut être corrélée avec la phototoxicité générale et un indice d'hydrophobie (temps de rétention) afin d'évaluer les relations possibles entre la structure chimique des ZnPcS₃C_n et leur activité photochimique (Article 2, tableau III.1). Pour faciliter la détection des relations potentielles entre la structure chimique et l'activité photodynamique, les paramètres *in vitro* sont exprimés en % de leurs valeurs maximales et en fonction des temps de rétention (Article 2, figures III.5A et III.5B). Les histogrammes montrent une relation claire entre la structure chimique et l'activité photodynamique dépendant de l'hydrophobie des ZnPcS (t_R), l'internalisation des ZnPcS, la phototoxicité (cellules tuées/photon absorbé) et la perméabilité de membrane plasmique induite par la TPD (le taux initial de la fraction internalisée de TMA-DPH).

En particulier pour des périodes d'incubation de 1 h, le potentiel photodynamique global correspond avec le taux initial de la fraction internalisée, suggérant un rôle important de l'intensité des dommages à la membrane plasmique dans l'effet général de la TPD (Article 2, figure III.5A). Après une période d'incubation de 24 h nous observons une augmentation dans l'accumulation intracellulaire de tous les ZnPcS qui correspond avec une augmentation de leur phototoxicité et une diminution de l'effet de la membrane plas-

mique, suggérant un changement dans les sites de photodommages de la membrane aux cibles intracellulaires (Figure III.5B). L'augmentation significative dans l'accumulation intracellulaire des ZnPcS_3C_6 , C_9 et C_{12} après une incubation de 24 heures ne se traduit par une augmentation proportionnelle de la phototoxicité, suggérant que leur internalisation supplémentaire ne contribue pas à augmenter leur potentiel phototoxique. $\text{ZnPcS}_3\text{C}_{16}$ est le seul ZnPcS dont une incubation prolongée cause une augmentation significative de l'intensité des dommages induits au niveau de la membrane plasmique probablement liée à un mécanisme d'internalisation plus lent et à sa forte tendance à s'agréger. Par conséquent une localisation membranaire et les dommages subséquents induits par ces PS sont des facteurs majeurs dans l'expression de leur potentiel photodynamique. La membrane plasmique représente donc une cible importante pour la TPD qui pourrait en partie expliquer l'importance de l'hydrophobie des ZnPcS pour des courtes périodes d'incubation.

V.2.5 Rôle de la membrane plasmique en TPD

Selon nos connaissances entourant les mécanismes d'action de la TPD, l'intensité des dommages induits au niveau de la membrane plasmique provoquerait un épuisement partiel ou total de l'ATP intracellulaire résultant à une mort cellulaire apoptotique ou nécrotique (Nishiyama et al., 2003; Ali et Olivo, 2002; Rockwell et al., 1972). Des études précédentes avec différents PS tels que l'étiopurpurine, la Photofrin, la mérocyanine 540 et des porphyrines dendrimériques ont démontré que la membrane constitue une cible importante pour la TPD (Brasseur et al., 1988; Kessel et al., 2003; Sharman et al., 1997). Nos conclusions coïncident dans ce sens et avec une étude récente de Fabris et al. indiquant que l'issue de la photosensibilisation, *in vitro*, avec un ZnPc non substitué pourrait être modulée d'un mécanisme de mort nécrotique (dommages de la membrane) à une mort apoptotique

(dommages intracellulaires) en réduisant la période d'incubation préalable avec les PS (Fabris et al., 2001).

V.3 Imagerie TEP de l'apoptose dans un modèle tumoral animal: ciblage avec l'annexine-V biotinée et ^{64}Cu -DOTA-biotine-SAv

V.3.1 Sélection de la méthode d'induction de l'apoptose

Nous avons décidé d'induire l'apoptose par thérapie photodynamique (TPD) dans des souris Balb/c portant deux adénocarcinomes mammaires EMT-6. Ce modèle est bien établi et reconnu pour induire une régression tumorale ou une mort cellulaire impliquant nécessairement l'apoptose. Les avantages de la TPD par rapport aux autres thérapies conventionnelles sont que ni le PS ni la lumière utilisée pour son activation sont toxiques, permettant un traitement localisé où seulement les cellules exposées simultanément à la lumière, au PS et à l' O_2 sont soumises aux effets cytotoxiques. La réponse tumorale peut facilement être modulée en changeant simplement le PS. Pour évaluer l'effet thérapeutique, l'illumination d'une seule tumeur est nécessaire ce qui nous confère l'avantage que le même animal porte la tumeur traitée et son contrôle subissant les mêmes variations physiologiques.

Les cellules EMT-6 dérivent d'une tumeur primaire mammaire obtenue chez une souris Balb/C après implantation d'un nodule alvéolaire hyperplasique (Rockwell SC, et al., 1972) et sont facilement implantables chez ce type de souris sans subir de régression spontanée. Cette lignée cellulaire tumorale se cultive facilement en laboratoire et nécessite seulement une semaine pour produire une tumeur de taille acceptable. De plus, l'agressivité de la lignée est facilement conservée par transfert direct ou indirect des cellules tumorales d'une souris à une autre.

V.3.2 Principales différences entre ZnPcS_2 et AlPcS_2

Nous avons choisi deux MPcS_2 en raison de leur nature amphiphile et de leur potentiel photodynamique élevé. La seule différence entre ces deux produits se situe au niveau du choix du métal incorporé au centre du macrocycle. La présence d'aluminium comme métal central ajoute un ligand OH axial qui augmente significativement son hydrophilie globale et modifie ses propriétés physicochimiques. L'hydrophilie de AlPcS_2 favorise son accumulation dans les liquides biologiques de la tumeur tandis que l'hydrophobie de ZnPcS_2 incite son incorporation dans les cellules de la tumeur (Nowis et al., 2005 a et b). Ces deux produits pourtant similaires possèdent des activités photodynamiques différentes importantes. Le tableau V.1 regroupe certaines propriétés de ces deux produits.

Tableau V.1 : Principales propriétés de ZnPcS₂ et de AlPcS₂

MPcS ₂	Hydrophobie	Phototoxicité ²		Incorporation cellulaire ³	Photooxydation du tryptophane ⁴	
					Rendement HPPI (%)	
	Rt (min)	LD ₅₀	LD ₉₀	nmole Pc / mg protéine	PBS	CRM 1%
AlPcS ₂	18.2	4.3	9.5	6.50	0.29	1.02
ZnPcS ₂	25.5	0.5	1.0	1.75	0.18	1.16

¹ Le temps de rétention des deux Pcs en minutes par HPLC en phase inversée avec une colonne C18. ² Le LD₅₀ ou LD₉₀ indique la valeur requise pour induire une mortalité de 50 % ou de 90 % des cellules EMT-6 après une incubation d'une heure avec 1 μ M de chacun des phthalocyanines. ³ Les cellules EMT-6 sont incubées avec ZnPcS₂ ou AlPcS₂ (10 μ M) pour 24 heures et la concentration intracellulaire des Pcs est déterminée et exprimée en nmole de Pc par mg de protéines cellulaires. ⁴ La quantité relative d'hydroperoxide (HPPI) formée de la photooxydation du L-tryptophane en utilisant le PBS ou le CRM 1% comme solvant est exprimée comme une valeur relative (%) par rapport à la valeur d'un produit de référence (AlPcS₄).

In vivo, leurs différences engendrent les particularités suivantes. Le ZnPcS₂ est reconnu pour avoir un effet rapide et direct sur les cellules causant des dommages vastes dans la zone illuminée. Son effet sur le système vasculaire est doux et limité à la perméabilisation des vaisseaux de la tumeur. ZnPcS₂ ne provoque pas de constriction vasculaire ou de réduction de débit sanguin durant l'illumination ce qui permet de maintenir un niveau adéquat d'oxygénation augmentant l'efficacité de la TPD (Fingar et al., 1993). Pour sa part AlPcS₂ agit d'abord en provoquant une action directe (~70%) suivie par une constriction vasculaire résultant à une chute approximative de 50% du débit sanguin dans la tumeur débutant 3 heures après la TPD. AlPcS₂ entraîne deux phases de mortalité successives dérivant des effets directs et indirects (Chan et al., 1996).

V.3.3 Marquage du complexe radioactif

La synthèse du complexe radioactif ^{64}Cu -DOTA-biotine-SAv exige une insertion préalable du cuivre dans le chélateur DOTA suivie par une association de la biotine avec la SAv. Le marquage de l'intermédiaire ^{64}Cu -DOTA-biotine a été confirmé par HPLC (figure V.2) pendant que l'union de la biotine radioactive avec la SAv a été vérifiée après migration sur gel d'acrilamide en condition dénaturante. L'obtention du même temps d'élution pour les deux complexes biotinés confirme l'insertion du cuivre qui sera aussi appuyée par la présence de radioactivité dans les puits du gel correspondant à l'ajout du complexe biotine DOTA et biotine-DOTA-SAv (Article 3, figure IV.2).

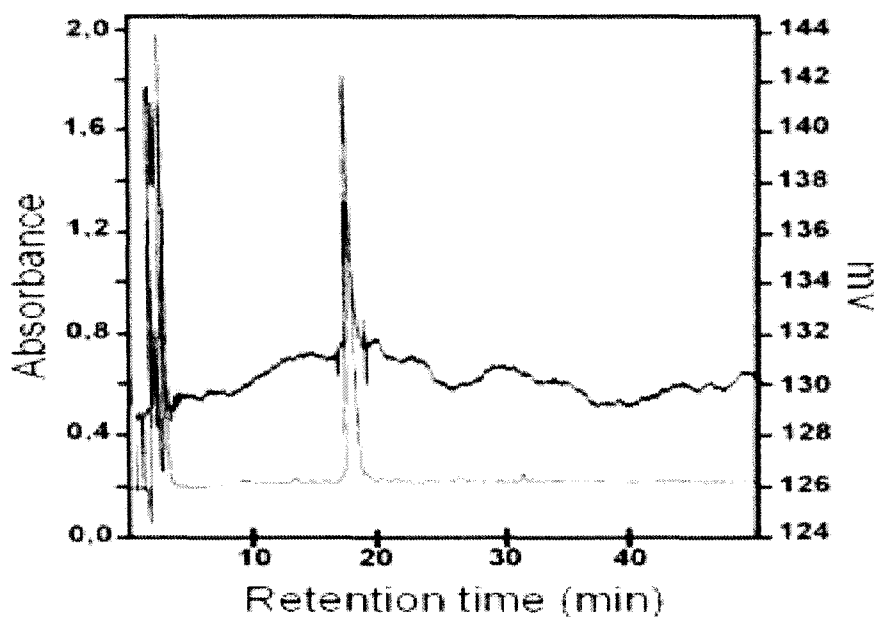


Figure V.2 : Spectres HPLC des complexes de la Biotine : Profil HPLC (phase inversée) du DOTA-biotine (trace inférieure) et du ^{64}Cu -DOTA-biotine (trace supérieure) éluée avec un gradient linéaire de 0,1% TFA en acétonitrile (5-50% plus de 40 minutes) à 1 ml/min. La radioactivité a été mesurée avec un détecteur (débit de compte) et le matériel non radioactif a été enregistré par un détecteur UV réglé à 280 nm.

L'observation de ce gel permet de déduire les faits suivants. Premièrement, le ^{64}Cu -DOTA-biotine et la SAv sous forme monomérique migrent à une vitesse équivalente en

dépôt des grandes différences de taille (778 vs. 14,5 KDa). L'influence de la charge sur la vitesse de migration de ce type d'électrophorèse pourrait expliquer cette situation. ^{64}Cu -DOTA-biotine possède une faible charge négative tandis que la SAV est fortement chargée par la présence de nombreuses molécules de SDS qui compensent apparemment la différence de taille. Deuxièmement, l'union de la biotine avec la SAV est confirmée par la détection d'une forme tétramérique radioactive sous des conditions dénaturantes. Finalement, la présence de SAV monomérique non marquée dans le puit contenant le ^{64}Cu -DOTA-biotine-SAV (Article 3, figure IV.2) confirme que le complexe contient moins que 0,75 unité de biotine par molécule de SAV (Gonzalez et al., 1997), laissant suffisamment de sites libres pour permettre l'interaction avec l'annexine-V biotinée.

V.3.4 Rendements obtenus

Notre méthode donne des rendements supérieurs à 95% pour l'insertion du cuivre dans le ^{64}Cu -DOTA-biotine (activité spécifique $\sim 15 \text{ GBq}/\mu\text{mol}$) et à 70% pour le conjugué ^{64}Cu -DOTA-biotine-SAV (activité spécifique $\sim 11 \text{ GBq}/\mu\text{mol}$) en se basant sur le contenu en cuivre. Une dose de 3 MBq de ^{18}F FDG est suffisante pour imager une souris de 20 g avec l'appareil TEP de l'Université de Sherbrooke, ce qui équivaut à une dose approximative de 12 à 15 MBq de ^{64}Cu . Deux études récentes, l'une par Sun et l'autre par Zimmerman ainsi que leurs collaborateurs respectifs, ont démontré qu'une dose de ^{64}Cu comprise entre 18 et 37 MBq pour des souris ou des rats suffit pour permettre une reconstruction précise des zones d'accumulation des différents radioconjugués (Sun et al., 2004; Zimmerman et al., 2003). En se basant sur la moyenne des doses utilisées, notre conjugué possède une activité suffisante pour permettre l'imagerie TEP adéquate.

V.3.5 Détection *in vitro* et *ex vivo* de l'apoptose par ^{64}Cu -DOTA-biotin-SAv

Pour évaluer l'intégrité de la SAv radioactive à reconnaître l'annexine-V biotinée attachée à la Pser externalisée, nous avons comparé l'accumulation cellulaire ou tissulaire de notre complexe radioactif avec celle d'un conjugué fluorescent commercial de la SAv sous des conditions *in vitro* et *ex-vivo*.

Après l'induction de l'apoptose par TPD dans des cellules EMT-6 *in vitro* et le pré-ciblage avec l'annexine-V biotinée, les deux sondes détectent un niveau équivalent d'apoptose induite. Les deux ne s'accumulent pas sur les cellules intactes et se lient aux cellules apoptotiques. (Article 3, figure IV.3A). De même, après TPD *in vivo* des tumeurs EMT-6, de l'excision et du marquage *ex vivo*, les sondes fluorescentes et radioactives de la SAv ont montré des profils semblables (Article 3, figure IV.3B). L'induction de l'apoptose a été confirmée dans les deux cas par la détection de la fragmentation caractéristique de l'ADN (Article 3, figure IV.4).

Les différences dans l'accumulation du ^{64}Cu en fonction de l'intervalle de temps entre la TPD et l'administration de l'annexine-V biotinée (Article 3, figure IV.3b) suggèrent des différences dans les mécanismes d'action entre les protocoles de traitement avec Al ou ZnPcS_2 . Une accumulation plus élevée des sondes après ZnPcS_2 -TPD est conforme à notre connaissance et correspond au niveau d'efficacité du colorant ZnPcS_2 à induire une mortalité cellulaire par effet direct. Après un délai de 24 heures, la détection de l'apoptose est pauvre pour les deux PS, en utilisant soit la sonde radioactive ou fluorescente, reflétant l'absence des cellules apoptotiques due à leur enlèvement physiologique du tissu tumoral par phagocytose ou par engouffrement. Ces deux expériences prouvent que notre complexe conserve son affinité pour se lier à l'annexine-V biotinée accumulée sur les cellules

apoptotiques, mais en plus il pourrait aussi mesurer à un certain niveau l'intensité des dommages induits.

V.3.6 Optimisation de l'approche par pré-ciblage

L'optimisation de la détection de l'apoptose et de la qualité de l'image dépend de la coordination des différentes étapes de cette approche. Le premier intervalle à considérer dans cette étude concerne la synchronisation de l'étape de pré-ciblage qui constitue le point déterminant du processus. Un préciblage efficace exige une estimation précise du moment d'injection de l'annexine-V biotinée, c.à-d. le temps requis après TPD pour tenir compte de l'expression optimale de l'apoptose. Nos données *in vivo* prouvent qu'une détection optimale de l'apoptose devrait être réalisée en injectant l'annexine-V biotinée tôt après la TPD (Article 3, tableau IV.1).

Les temps d'injection de l'Av et du complexe radioactif sont importants, mais considérés moins critiques pour l'instant et seront évalués dans une étude subséquente. Pour ces deux étapes, l'intervalle de temps minimal doit correspondre approximativement au double du temps nécessaire pour éliminer la moitié de la concentration du produit injecté. En se basant sur les données de la littérature, nous avons arbitrairement fixé la durée de ces intervalles à deux heures pour toutes les expériences subséquentes (Subbarayan et al., 2003; Lahorte et al., 2003; Collingridge et al., 2003; Sakahara et Saga, 1999, Gruaz-Guyon et al., 2005; Mirallié et al., 2005; Kobayashi et al., 1995).

L'intervalle de temps après l'injection du traceur est très importante pour optimiser la qualité de l'image et dépend de la vitesse d'élimination du traceur de la circulation sanguine. La courbe de clairance sanguine indique qu'une période de 3 heures est nécessaire pour atteindre un taux d'élimination du traceur supérieur à 90% (Article 3, figure IV.5).

Pour les études de distribution et d'imagerie TEP, la synchronisation des différentes étapes sera fixée de la manière suivante: une trentaine de minutes pour la TPD, pré-ciblage immédiat après TPD, suivi 2 heures plus tard par une clairance sanguine avec l'Av et encore deux heures plus tard (4 h après TPD) par l'injection du ^{64}Cu -DOTA-biotin-SAv.

V.3.7 Distribution du ^{64}Cu -DOTA-biotin-SAv dans notre modèle animal

L'évaluation de la distribution du complexe ^{64}Cu -SAv montre peu de différence dans la distribution globale entre les animaux traités et de référence. Les reins montrent la plus forte accumulation de ^{64}Cu selon l'élimination du ^{64}Cu -DOTA-biotin-SAv en grande partie par l'intermédiaire de la voie urinaire. Des observations semblables ont été faites avec l'annexine-V radioactive et différentes hypothèses ont été avancées pour expliquer l'importance de l'accumulation rénale. Une présence potentielle de Pser externalisées dans les reins a été éliminée par Blankenberg et autres (Blankenberg et al., 2004). Leurs études ont indiqué que différents analogues d'annexine-V possédant des efficacités différentes pour détecter l'apoptose naturelle dans le foie et la rate, exhibaient des mêmes valeurs d'accumulation rénale.

En ce qui concerne les tissus non cibles (Article 3, tableau IV.2), on note une diminution significative de l'activité sanguine qui entraîne une augmentation du rapport tissus sang pour le foie, les poumons et la rate par rapport aux valeurs du groupe contrôle. Une présence significative de ^{64}Cu -DOTA-biotin-SAv dans le muscle non illuminé entourant la tumeur traitée ainsi qu'une diminution ($P < 0,05$) de l'activité du traceur dans la tumeur de référence suivant la TPD (0,45 à 0,11 %ID/g) sont aussi observées et suggèrent une réponse systémique découlant de la TPD. L'induction d'une réaction immunologique systémique suivant la TPD est bien documentée et pourrait expliquer ces anomalies (Castano et

al., 2005b; Bérard et al., 2006 sous presse; Fingar et al., 1993; Blankenberg et al 2004). Les changements dans les rapports tumeur/sang peuvent également résulter des modifications au niveau de la perméabilité et de la perfusion vasculaire de la tumeur (Article 3, tableau IV.2). Il est bien connu que la TPD affecte fortement le débit sanguin de la tumeur en induisant un relâchement d'une variété de composés vasoactifs et que l'intensité de ce phénomène se relie directement à l'hydrophobie du PS (Chan et al., 1996; Fingar et al., 1993).

V.3.8 Détection *in vivo* de l'apoptose par notre méthode de pré-ciblage

Plusieurs signes indicateurs révèlent une spécificité de l'accumulation du complexe radioactif après TPD. Une accumulation significative du ^{64}Cu dans la tumeur traitée et une détection minimale d'apoptose dans la tumeur contrôle. L'intensité de ^{64}Cu augmente progressivement en fonction de la longueur de l'intervalle de temps entre l'injection du traceur et du moment d'imagerie surtout au niveau de la tumeur traitée. L'omission de l'étape de pré-ciblage avec l'anx V biotinée engendre une accumulation non significative du ^{64}Cu dans la tumeur traitée, l'omission de l'étape de clairance n'empêche pas une certaine accumulation dans la zone affectée mais affecte surtout le contraste de l'image bien qu'une application complète du protocole distingue clairement la zone apoptotique dans la tumeur traitée (Article 3, figure IV.6 a,b et c). En variant le temps d'injection de l'anx V biotinée ou en utilisant des ZnPcS qui ont des potentiels photothérapeutiques différents, la variation dans l'intensité de l'accumulation de notre complexe a permis de détecter un gradient d'apoptose dans les tumeurs illu-

minées et de déduire une induction d'un effet systémique découlant de l'activité photodynamique.

V.3.9 Résultats obtenus par imagerie TEP

Les résultats de l'imagerie TEP des animaux traités avec ^{64}Cu -DOTA-biotine-SAv après l'application du protocole complet de préciblage ont montré un profil de distribution du traceur dans les tumeurs et les organes non ciblés conforme à celui énoncé dans les études de biodistribution. La vessie et les reins sont très bien tracés sur toutes les images tandis que l'accumulation du ^{64}Cu diminue d'une manière décroissante en passant par le foie, le cœur, les poumons et les intestins (Article 3, figure IV.6A). La clairance rapide du ^{64}Cu -DOTA-biotin-SAv par l'intermédiaire de la voie urinaire était évidente par une importante détection de la radioactivité dans la vessie dès 30 minutes après injection du traceur (4,5 h après TPD). La présence des cellules apoptotiques dans les tumeurs illuminées était facilement déduite des premiers balayages enregistrés 30 minutes après administration de traceur et demeurait encore évidente sur les balayages 24 heures après l'injection du radioconjugué. D'autre part, peu ou pas d'activité pouvait être détectée dans la tumeur de référence (voir Article 3, figure IV.6 B-c pour la position des tumeurs). Des balayages saisis sur la même souris à des intervalles périodiques après l'injection du traceur nous permet de déceler une augmentation appréciable de l'intensité de la radioactivité dans la tumeur traitée et dans la vessie ce qui nous indique une rétention du produit dans ces deux organes. La rétention tumorale pourrait être un indice d'un accroissement de la reconnaissance des sites apoptotiques et l'autre un refus de l'animal à uriner pendant la durée de l'imagerie.

L'intervalle optimal de temps entre l'administration de ^{64}Cu -DOTA-biotine-SAv et l'imagerie TEP change avec l'efficacité du traitement des tumeurs (Article 3, figure IV.7). Après un traitement plus agressif avec ZnPcS_2 -TPD, on a observé une incorporation plus élevée du ^{64}Cu dès ~7 h après traitement pour ensuite se résorber progressivement jusqu'à l'obtention d'un plateau temporaire. En revanche, après AlPcS_2 -TPD, nous observons une réponse hâtive plus modérée qui s'accroît brusquement pour atteindre un contraste optimal dans la tumeur traitée vers 10 à 11 heures après traitement TPD reflétant une réponse apoptotique retardée. Cette approche peut en plus détecter des différences dans les mécanismes d'action des traitements.

V.3.10 Potentiel clinique de cette méthode en oncologie

D'un point de vue clinique, cette méthode non invasive d'imagerie fournirait aux différents médecins spécialistes un outil diagnostique flexible pour vérifier l'efficacité des traitements anticancéreux, d'estimer la progression ou la régression des maladies provoquées par un déséquilibre de la mort cellulaire, de visualiser les zones d'inflammation, de déterminer la tolérance ou le rejet des transplants, d'identifier les cellules endommagées des vaisseaux sanguins et des principaux organes (cœur et cerveau), de détecter la cardiotoxicité de la doxorubicine, d'étudier les plaques de l'athérosclérose et d'évaluer la gravité de nombreux désordres.

Une approche de pré-ciblage augmenterait la flexibilité par rapport à la méthode de marquage directe utilisant $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -anxV. L'étape initiale de pré-ciblage peut être répétée pour augmenter l'accumulation du traceur par les tissus cibles tandis que la synchronisation et les doses de tous les produits administrés peuvent également être modulées. Ainsi les différentes étapes de cette méthode de pré-ciblage peuvent être ajustées pour s'adapter

aux processus biologiques ou thérapeutiques à l'étude, ayant pour résultat un contraste amélioré de l'image et la détection optimale de l'apoptose.

VI CONCLUSION

En résumé, les propriétés amphiphiles des PcS_3 peuvent être améliorées par l'addition d'une chaîne linéaire de carbones au macrocycle du Pc. L'hydrophobie des différents dérivés du zinc trisulfoné (ZnPcS_3) joue un rôle clé dans l'incorporation cellulaire, la photocytotoxicité et affecte aussi leur agrégation dans les différents solvants. L'ajout d'une chaîne linéaire de 6 à 9 carbones à ZnPcS_3 (ZnPcS_3C_6 et ZnPcS_3C_9) engendre deux PS plus actifs possédant une hydrophobie et un comportement biologique similaire au composé amphiphile ZnPcS_2 . Les avantages de ces nouveaux dérivés sur ZnPcS_2 se situent au niveau d'une synthèse chimique simplifiée donnant un produit pur facilement identifiable.

Un court temps d'incubation favorise la présence de Pcs à l'intérieur de la couche lipidique de la membrane plasmique. Le taux initial de la fraction internalisée constitue un bon indicateur des propriétés hydrophiles/hydrophobes des PS. Cette approche a permis d'établir l'existence et l'importance de la relation entre l'hydrophobie du PS et la localisation des PS dans la membrane plasmique. Après une courte incubation, les plus amphiphiles ZnPcS_3C_6 et ZnPcS_3C_9 ciblent la membrane plasmique, par la suite l'illumination déclenche des vastes dommages à la membrane plasmique et une mort cellulaire par nécrose. Après une incubation prolongée (24 heures) la majorité des ZnPcS migre vers les compartiments intracellulaires, déclenchant une mort cellulaire par des voies apoptotiques. Ainsi, nos données démontrent que la mort cellulaire induite par TPD peut être modulée par le choix du PS et par la durée du temps d'incubation de la drogue avant l'illumination. Ces conclusions appuient les relations structurales établies dans la premier article de cette thèse pour la même série de ZnPcS et confirment que les propriétés amphiphiles des ZnPcS jouent un rôle clé durant leur accumulation intracellulaire et sur leur photocytotoxicité.

Dans le troisième article de cette thèse, nous avons démontré l'efficacité d'une procédure de pré-ciblage en trois étapes pour l'imagerie TEP de l'apoptose. Cette procédure offre une flexibilité d'adapter les intervalles de temps entre les diverses étapes pour accommoder les protocoles de traitement choisis. Ainsi les intervalles entre l'intervention clinique, le pré-ciblage avec l'annexine-V biotinée non radioactif, le nettoyage avec l'Av et l'administration du radiopharmaceutique peuvent tous être modulés pour optimiser la détection de l'apoptose. Nos données confirment aussi l'utilité de la TEP pour évaluer l'efficacité des protocoles de traitement du cancer.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier mon directeur de thèse, Dr. van Lier et mon codirecteur, Dr Darel Hunting pour avoir cru en moi et m'avoir accueillie dans leurs équipes respectives. Merci pour tous vos conseils, votre support et vos encouragements. Je tiens particulièrement à vous remercier pour m'avoir permis de renouer avec la recherche et pour votre collaboration durant les étapes de recherche, d'expérimentation et de rédaction des articles inclus dans cette thèse.

Merci à François Bénard, Guylain Boissneault, Roy Pottier qui ont gentiment accepté la tâche ingrate de corriger ma thèse. J'apprécie vos efforts et vos commentaires seront fortement appréciés.

Un immense merci à Roger Lecomte pour m'avoir permis d'utiliser son TEP animal, ses conseils judicieux et son aide précieuse pour la révision de plusieurs versions de l'article sur l'utilisation du ^{64}Cu -DOTA-biotin Sav. J'aimerais remercier particulièrement Mélanie pour son aide technique et Jules pour son appui constant entourant les périodes d'acquisitions des données TEP.

J'aimerais remercier personnellement le Dre Nicole Brasseur pour avoir consacré bénévolement de son temps pour m'initier aux protocoles expérimentaux entourant la thérapie photodynamique des petits animaux. Merci à Carole et à Sonia pour leur aide technique et m'avoir accompagnée durant mes premières expériences.

Merci à Réjean et à Hasrat pour leur aide en chimie, sans toi Réjean, le projet sur l'apoptose n'aurait sûrement pas atteint ses objectifs. Merci Jacques pour ton appui constant dans plusieurs domaines scientifiques et pour ta grande disponibilité. Je voudrais spécialement remercier Rosalie pour avoir consacré une grande partie de sa fin de semaine de Pâques à relire et à corriger la version finale de ma thèse.

Je voudrais aussi souligner le professionnalisme de nos deux secrétaires Francine et Pierrette. Merci à vous deux pour votre grand support quotidien. Finalement, je ne peux oublier de remercier Benoit Paquette et Wesley Sharman pour leur ouverture, leur disponibilité et leur aide à des moments stratégiques durant mes études doctorales.

RÉFÉRENCES

1. Acroyd R., Kelty C., Brown N., Reed M. (2001) The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochem Photobiol.* **74**, 656-669.
2. Ali H., Langlois R., Wagner J. R., Brasseur N., Paquette B., van Lier, J.E. (1988) Biological activities of phthalocyanines-X. Syntheses and analyses of sulfonated phthalocyanines. *Photochem Photobiol.* **47**, 73-77.
3. Ali S.M., Olivo M. (2002) Bio-distribution and subcellular localization of Hypericin and its role in PDT induced apoptosis in cancer cells. *Int J Oncology* **2**, 531-540
4. Allen C.M., Langlois R., Sharman W.M., La Madeleine C., van Lier J.E. (2002) Photodynamic properties of amphiphilic derivatives of aluminum tetrasulfophthalocyanine, *Photochem Photobiol.* **76**, 208-216.
5. Allen C.M., Sharman W.M., La Madeleine C., Weber J.M., Langlois R., Ouellet R., van Lier J.E. (1999) Photodynamic therapy: tumor-targeting with adenoviral proteins. *Photochem Photobiol.* **70**, 512-523.
6. Allen C.M., Sharman W.M., van Lier J.E. (2001) Current status of phthalocyanines in the photodynamic therapy of cancer. *J. Porphyrins Phthalocyanines.* **5**, 161-169.
7. Allison R.R., Downie G.H., Cuenca R., Hu X.-H., Childs C.J.H., Sibata C.H. (2004a) Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiag Photodyn Ther.* **1**, 27-42.
8. Allison R.R., Mota H.C., Sibata C.H. (2004b) Clinical PD/PDT in North America: An historical review. *Photodiag Photodyn Ther.* **1**, 263-277.
9. Bérard V., Rousseau J.A., Cadorette J., Hubert L., Bentourkia M., van Lier J.E., Lecomte R. (2006) Dynamic Imaging of Transient Metabolic Processes by Small Animal Positron Emission Tomography for the Evaluation of Photosensitizers in Photodynamic Therapy of Cancer, *J Nucl Med.* **47**, *in press*

10. Berry M.D., Boulton A.A., Ashe P.C. (2001) Apoptotic signaling cascades. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. **25**, 691-707.
11. Berthod A., Carda-Broch S. (2004) Determination of liquid-liquid partition coefficients by separation methods. *J Chromatogr A*. **1037**, 3-14.
12. Bicknell G.R., Cohen G.M. (1995) Cleavage of DNA to large kilobase pair fragments occurs in some forms of necrosis as well as apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. **207**, 40-47.
13. Blankenberg F.G., Smith C., Gibson D.F., Tait J.F. (2004) Different factors control renal versus hepatic and splenic uptake of Annexin V. *J Nucl Med*. **45**, 149-150.
14. Blankenberg F.G., Tait J., Ohtsuki K., Strauss H.W. (2000) Apoptosis: the importance of nuclear medicine. *Nucl Med Commun*. **2**, 24 -50.
15. Blankenberg, F.G., Katsikis P.D., Storrs R.W., Beaulieu C., Spielman D., Chen J.Y., Naumovski L., Tait J.F. (1997) Quantitative analysis of apoptotic cell death using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Blood*. **89**, 3778-3786.
16. Boersma H.H., Kietselaer B.L., Stolk L.M., Bennaghmouch A., Hofstra L., Narula J., Heidendal G.A., Reutelingsperger C.P. (2005) Past, present, and future of annexin A5: From protein discovery to clinical applications. *J Nucl Med*. **46**, 2035-2050.
17. Boersma H.H., Liem I.H., Kemerink G.J., Thimister P.W., Hofstra L., Stolk L.M., van Heerde W.L., Pakbiers M.T., Janssen D., Beysens A.J., Reutelingsperger C.P., Heidendal G.A. (2003) Comparison between human pharmacokinetics and imaging properties of two conjugation methods for ^{99m}Tc-annexin A5. *Br J Radiol*. **76**, 553-560.

18. Brasseur N., Ali H., Langlois R., van Lier J.E. (1987) Biological activities of phthalocyanines--VII. Photoinactivation of V-79 Chinese hamster cells by selectively sulfonated gallium phthalocyanines. *Photochem Photobiol.* **46**,739-744.
19. Brasseur N., Ali H., Langlois R., van Lier J.E. (1988) Biological activities of phthalocyanines IX. Photosensitization of V-79 Chinese hamster cells and EMT-6 mouse mammary tumor by selectively sulfonated zinc phthalocyanines. *Photochem Photobiol.* **47**, 705-713.
20. Brasseur N., Langlois R., La Madeleine C., Ouellet R., van Lier J.E. (1999), Receptor-mediated targeting of phthalocyanines to macrophages via covalent coupling to native or maleylated bovine serum albumin. *Photochem Photobiol.* **69**, 345-352.
21. Brasseur N., Nguyen T.L., Langlois R., Ouellet R., Marengo S., Houde D., van Lier J.E. (1994) Synthesis and photodynamic activities of silicon 2,3-naphthalocyanine derivatives, *J Med Chem.* **37**, 415-420.
22. Bröker L.E., Kruyt F.A., Giaccone G. (2005) Cell death independent of caspases: a review. *Cli Cancer Res.* **11**, 3155-3162.
23. Bronner C., Landry Y. (1991) The use of the potential-sensitive fluorescent probe bisonol in mast cells. *Biochim Biophys Acta* **1070**, 321-331.
24. Bronner C., Landry Y., Fonteneau P., Kuhry J.-G. (1986) A fluorescent hydrophobic probe used for monitoring the kinetics of exocytosis phenomena. *Biochemistry.* **25**, 2149-2154.
25. Brown S.B., Brown E.A., Walker I. (2004) The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. *Lancet Oncol.* **5**,497-508.

26. Castano A.P., Demidova T.N., Hamblin M.R. (2005a) Mechanisms in photodynamic therapy: part two-cellular signalling, cell metabolism and modes of cell death. *Photodiagn Photodyn Ther.* **2**, 1-23.
27. Castano A.P., Demidova T.N., Hamblin M.R. (2005b) Mechanisms in photodynamic therapy: part three-photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction, *Photodiagn Photodyn Ther.* **2**, 91-106.
28. Castano A.P., Tatiana N.D., Hamblin M.R. (2004) Mechanisms in photodynamic therapy: part one-photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagn Photodyn Ther.* **1**, 279-293.
29. Cecic I., Korbelik M. (2002) Mediators of peripheral blood neutrophilia induced by photodynamic therapy of solid tumors. *Cancer Lett.* **83**, 43-45
30. Chan W.-S., Ali H., van Lier J.E. (1996) Evidence for different mechanisms of EMT-6 tumor necrosis by photodynamic therapy with disulfonated aluminum phthalocyanine or photofrin: Tumor cell survival and blood flow. *Anticancer Res.* **16**, 1887-1892.
31. Chatelier R.C., Sawyer W.H., Swincer A.G., Ward A.D. (1985) Methods in porphyrin photosensitization (Edited by Kessel, D.), Plenum Press, NY, p 169.
32. Chatelier R.C., Sawyer W.H., Swincer A.G., Ward A.D. (1985) Porphyrin-membrane interactions: structural, kinetic and thermodynamic aspects studied using fluorescence techniques. *Adv Exp Med Biol.* **193**, 169-180.
33. Chen L.B. (1988) Mitochondrial membrane potential in living cells. *Annu Rev Cell Biol.* **4**, 155-181.
34. Chen W.R., Zhu W.G., Dynlacht J.R., Liu H., Nordquist R.E. (1999) Long-term tumor resistance induced by laser photo-immunotherapy. *Int J Cancer.* **81**, 808-812.

35. Christensen T. and Moan J. (1980) Photodynamic effects of haematoporphyrin (HP) on cells cultivated *in vitro*. In: R. Pratesi and C.A. Sacchi (eds.), *Lasers in Photomedicine and Photobiology*, pp. 87-91, Berlin, Heidelberg and New York: Springer Verlag.
36. Collingridge D.R., Glaser M., Osman S., Barthel H., Hutchinson O.C., Luthra S.K., Brady F., Bouchier-Hayes L., Martin S.J., Workman P., Price P., Aboagye E.O. (2003) *In vitro* selectivity, *in vivo* biodistribution and tumour uptake of annexin V radiolabelled with a positron emitting radioisotope. *Br J Cancer*. **89**, 1327-1333.
37. Coupin G.T., Muller C.D., Rémy-Kristensen A., Kuhry, J.-G. (1999) Cell surface membrane homeostasis and intracellular traffic balance in mouse L929 cells. *J Cell Science* **2**, 2431 -2440.
38. Cremonesi M., Ferrari M., Chinol M., Stabin M.G., Grana C., Prisco G., Robertson C., Tosi G., Paganelli G., (1999) Three-step radioimmunotherapy with yttrium-90 biotin: dosimetry and pharmacokinetics in cancer patients, *Eur J Nucl Med*. **26**, 110-120.
39. Dąbrowska A., Goś M., Janik P. (2005) Bystander effect induced by photodynamically or heat-injured ovarian carcinoma cells (OVP10) *in vitro*. *Med Sci Monit*. **11**, BR 316-324
40. Dellinger M. (1996) Apoptosis or necrosis following Photofrin® photosensitization: influence of the incubation protocol. *Photochem Photobiol*. **64**, 182-187.
41. DeRosa M.C., Crutchley R.J. (2002) Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coordination Chemistry Reviews*. **233-234**, 351-371
42. Dong Z., Saikumar P., Weinberg J.M., Venkatachalam M.A. (1997) Internucleosomal DNA cleavage triggered by plasma membrane damage during necrotic cell

- death. Involvement of serine but not cysteine proteases. *Am J Pathol.* **151**, 1205-1213.
43. Dougherty T.J., Gomer C.J., Henderson B.W., Jori G., Kessel D., Korbélik M., Moan J., Peng Q. (1998) Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst.* **90**, 889-905.
44. Ebbesen P., Pettersen E.O., Denekamp J., Littbrand B., Keski-Oja J., Schousboe A., Sonnewald U., Amellem O., Zachar V. (2000) Hypoxia, normoxia and hyperoxia-terminology for medical *in vitro* cell biology. *Acta Oncol.* **39**, 247-248.
45. Emoto K., Toyama-Sorimachi N., Karasuyama H., Inoue K., Umeda M. (1997) Exposure of phosphatidylethanolamine on the surface of apoptotic cells. *Exp Cell Res.* **232**, 430-434.
46. Fabris C., Valcuga G., Miotta G., Borsetto L., Jori G., Garbisa S., Reddi E. (2001) Photosensitization with zinc (II) phthalocyanines as a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *Cancer Res.* **61**, 7495-7500.
47. Fingar V.H., Wieman T.J., Karavolos P.M., Doak K.W., Ouellet R., van Lier J.E. (1993) The effects of photodynamic therapy using differently substituted zinc phthalocyanines on vessel constriction, vessel leakage and tumor response. *Photochem Photobiol.* **58**, 251-258.
48. Foote C.S. (1991) Definition of type I and type II photosensitized oxidation. *Photochem Photobiol.* **54**, 659.
49. Fuchs J., Thiele J. (1998) The role of oxygen in cutaneous photodynamic therapy. *Free Radic Biol Med.* **24**, 835-847.
50. Gantchev T.G., Urumov I.J., Hunting D.J. and Van Lier J.E. (1994a) Photocytotoxicity and intracellular generation of free radicals by tetrasulphonated Al- and Zn-phthalocyanines. *Int J Radiat Biol.* **65**, 289-298.

51. Gantchev T.G., Urumov I.J., van Lier J.E. (1994b) On the relationship between rate of uptake of Photofrin and cellular responses to photodynamic treatment *in vitro*. *Cancer Biochem. Biophys.* **4**, 23-34.
52. George J.E. 3rd, Ahmad Y., Varghai D., Li X., Berlin J., Jackowe D., Jungermann M., Wolfe M.S., Lilge L., Totonchi A, Morris R.L., Peterson A., Lust W.D., Kenney M.E., Hoppel C.L., Sun J., Oleinick N.L., Dean D. (2005) Pc 4 photodynamic therapy of U87-derived human glioma in the nude rat. *Lasers Surg Med.* **36**, 383-389.
53. Gilissen M.J., van de Merbel-de Wit L.E., Star W.M., Koster J.F., Sluiter W. (1993) Effect of photodynamic therapy on the endothelium-dependent relaxation of isolated rat aortas. *Cancer Res.* **53**, 2548-2552.
54. Gonzalez M., Bagatolli L.A., Echabe I., Arrondo J.L., Argarana C.E., Cantor C.R., Fidelio G.D. (1997) Interaction of biotin with streptavidin. Thermostability and conformational changes upon binding. *J Biol Chem.* **272**, 11288-11294.
55. Gruaz-Guyon A., Raguin O., Barbet J. (2005) Recent advances in pretargeted radio-immunotherapy. *Curr Med Chem.* **12**, 319-338.
56. Hasan T., Moor A.C.E., Ortel B. (2000) Photodynamic therapy of cancer in *Cancer Medicine* C.S., Decker BC , American cancer society, chapter 36, pp 399-502
57. He J., Larkin H.E., Li Y.S., Rihter D., Zaidi S.I., Rodgers M.A., Mukhtar H., Kenney M.E., Oleinick N.L. (1997) The synthesis, photophysical and photobiological properties and *in vitro* structure-activity relationships of a set of silicon phthalocyanine PDT photosensitizers. *Photochem Photobiol.* **65**, 581-586.
58. Henderson B.W., Dougherty T.J. (1992) How does photodynamic therapy work? *Photochem Photobiol.* **55**, 45- 57.

59. Hofstra L., Dumont E.A., Thimister P.W., Heidendal G.A., DeBruine A.P., Elenbaas T.W., Boersma H.H., van Heerde W.L., Reutelingsperger C.P. (2001) *In vivo* detection of apoptosis in an intracardiac tumor. *JAMA*. **285**, 1841-1842.
60. Hogset A., Prasmickaite L., Selbo P.K., Hellum M., Engesaeter B.O., Bonsted A., Berg K. (2004) Photochemical internalisation in drug and gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. **56**, 95-115.
61. Hsieh Y.J., Wu C.C., Chang C.J., Yu J.S. (2003) Subcellular localization of Photofrin determines the death phenotype of human epidermoid carcinoma A43 cells triggered by photodynamic therapy: when plasma membranes are the main targets. *J Cell Physiol*. **194**, 363-375.
62. Huang Z. (2005) A review of progress in clinical photodynamic therapy. *Technol Cancer Res Treat*. **4**, 283-293.
63. Illinger D. Kuhry J.-G. (1994) The kinetic aspects of intracellular fluorescence labeling with TMA-DPH support the maturation model for endocytosis in L929 Cells. *J Cell Biol.*, **125**, 783-794
64. Jendraszak, M., Warchol J.B., Scheffer S.R. (2002) Apoptotic, but not necrotic, tumor cell vaccines induce a potent immune response *in vivo*. *Folia Histochem Cytobiol*. **40**, 111-112.
65. Jessel R., Haertel S., Socaciu C., Tykhonova S., Diehl H.A. (2002) Kinetics of apoptotic markers in exogeneously induced apoptosis of EL4 cells, *J Cell Mol Med*. **6**, 82-92.
66. Kahn E., Lizard G., Frouin F., Bernengo J.C., Souchier C., Bessede G., Clement O., Siitari H., Gambert P., Frija G., Todd-Pokropek A. (2001) Confocal analysis of phosphatidylserine externalization with the use of biotinylated annexin V revealed

- with streptavidin-FITC, -europium, -phycoerythrin or -Texas Red in oxysterol-treated apoptotic cells. *Anal Quant Cytol Histol.* **23**, 47-55.
67. Kemerink G.J., Boersma H.H., Thimister P.W., Hofstra L., Liem I.H., Pakbiers M.T., Janssen D., Reutelingsperger C.P., Heidendal G.A. (2001a) Biodistribution and dosimetry of ^{99m}Tc -BTAP-annexin-V in humans. *Eur J Nucl Med.* **28**, 1373-1378.
68. Kemerink G.J., Liem I.H., Hofstra L., Boersma H.H., Buijs W.C., Reutelingsperger C.P., Heidendal G.A. (2001b) Patient dosimetry of intravenously administered ^{99m}Tc -annexin V. *J Nucl Med.* **42**, 382-387
69. Kemerink G.J., Liu X., Kieffer D., Ceysens S., Mortelmans L., Verbruggen A.M., Steinmetz N.D., Vanderheyden J.L., Green A.M., Verbeke K. (2003) Safety, biodistribution, and dosimetry of ^{99m}Tc -HYNIC-annexin V, a novel human recombinant annexin V for human application. *J Nucl Med.* **44**, 947-952.
70. Kessel D., Luguya R., Vicente M.G. (2003) Localization and photodynamic efficacy of two cationic porphyrins varying in charge distributions. *Photochem Photobiol.* **78**, 431-435.
71. Kessel D., Luo Y. (2001) Intracellular sites of photodamage as a factor in apoptotic cell death. *J. Porphyrins Phthalocyanines.* **5**, 181-184.
72. Kessel D., Luo Y., Deng Y., Chang C.K. (1997) The role of subcellular localization in initiation of apoptosis by photodynamic therapy. *Photochem Photobiol.* **65**, 422-426.
73. Kessel D., Luo Y., Mathieu P., Reiners J.J. (2000) Determinants of the Apoptotic Response to Lysosomal Photodamage. *Photochem Photobiol.* **7**, 196-200

74. Kessel D., Thompson P., Saatio K., Nantwi K. D. (1987) Tumor localization and photosensitization by sulfonated derivatives of tetraphenylporphine. *Photochem Photobiol.* **45**, 787-790.
75. Kitagawa S., Tachikawa E., Kashimoto T., Yasua N., Iida A., Fujita T. (1998) Asymmetrical membrane fluidity of bovine adrenal chromaffin cells and granules and effect of trichosporin-B-VIa. *Biochim Biophys Acta*, **1375**, 93-100.
76. Kobayashi H., Sakahara H., Endo K., Hosono M., Yao Z.S., Toyama S., Konishi J. (1995) Comparison of the chase effects of avidin, streptavidin, neutravidin, and avidin-ferritin on a radiolabeled biotinylated anti-tumor monoclonal antibody. *Jpn J Cancer Res.* **86**, 310-314.
77. Kongshaug M., Moan J., Brown S.B. (1989) The distribution of porphyrins with different tumor localizing ability among human plasma proteins. *Br J Cancer* **59**, 184-188.
78. Korbélik M., Cecic I. (2003) Mechanism of tumor destruction by photodynamic therapy in Handbook of photochemistry and photobiology, Stevenson Ranch, CA, vol. 1, Chapter 2, pp 39-77.
79. Korbélik M., Krosi G., Krosi J., Dougherty G.J. (1996) The role of host lymphoid populations in the response of mouse EMT6 tumor to photodynamic therapy. *Cancer Res.* **56**, 5647-5652.
80. Krammer B. (2001) Vascular effects of photodynamic therapy. *Anticancer Res.* **2**, 4271-4277.
81. Kudrevich S., Brasseur N., La Madeleine C., Gilbert S., van Lier J.E. (1997) Syntheses and photodynamic activities of novel trisulfonated zinc phthalocyanine derivatives. *J Med Chem.* **40**, 389-3904

82. Lahorte C.M., van de Wiele C., Bacher K., van den Bossche B., Thierens H., van Belle S., Slegers G., Dierckx R.A. (2003) Biodistribution and dosimetry study of ²³¹I-rh-annexin V in mice and humans. *Nucl Med Commun.* **24**, 871-880.
83. Lahorte C.M.M., Vanderheyden J.L., Steinmetz N., Van de Wiele C., Dierckx R.A., Slegers G. (2004) Apoptosis-detecting radioligands: current state of the art and future perspectives. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* **3**, 887-919.
84. Lewis J.S., Lee J.A., Underwood J.C., Harris A.L., Lewis C.E. (1999) Macrophage responses to hypoxia: relevance to disease mechanisms. *J Leuk Biol.* **66**, 889-900.
85. Lewis M.R., Kao J.Y., Anderson A.L., Shively J.E., Raubitschek A. (2001) An improved method for conjugating monoclonal antibodies with N-hydroxysulfosuccinimidyl DOTA. *Bioconjug. Chem.* **2**, 320-324.
86. Lewis M.R., Wang M., Asworthy D.B., Theodore L.J., Mallet R.W., Frizberg A.R., Welch M.J., Anderson C.J. (2003) *In vivo* Evaluation of Pretargeted ⁶⁴Cu for tumor imaging and therapy. *J Nucl Med.* **44**, 1284-1292
87. Lukyanets E.A. (1999) Phthalocyanines as photosensitizers in the photodynamic therapy of cancer. *J. Porphyrins Phthalocyanines.* **3**, 424-432
88. Margaron P., Madarnas P., Ouellet R., van Lier J.E (1996) Biological activities of phthalocyanines-XVII. Histopathological evidence for different mechanisms of EMT-6 tumor necrosis induced by photodynamic therapy with disulfonated aluminum phthalocyanine or photofrin. *Anticancer Res.* **16**, 613-620.
89. McCarthy D.W., Shefer R.E., Klinkowstein R.E., Bass L.A., Margeneau W.H., Cutler C.S., Anderson C.J., Welch M.J. (1997) Efficient production of high specific activity ⁶⁴Cu using a biomedical cyclotron. *Nucl Med Biol.* **24**, 35-43.

90. Mirallié E., Sai-maurel C., Faivre-Chauvet A., Regenet N., Chang C.-H., Goldenberg D.M., Chatal J.F., Barbet J., Thedrez P. (2005) Improved pretargeted delivery of radiolabelled hapten to human tumor xenograft in mice by avidin chase of circulating bispecific antibody. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. **32**, 901-909
91. Mitton D., Ackroyd R. (2005) History of photodynamic therapy in Great Britain. *Photodiag Photodyn Ther*. **2**, 239-246.
92. Moan J., Peng Q. (2003) An outline of the Hundred-year History of PDT. *Anticancer Res*. **23**, 359-3600.
93. Moor A.C. (2000) Signaling pathways in cell death and survival after photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B Biol*. **57**, 1-13.
94. Nishiyama N., Stapert H.R., Zhang G.-D., Takasu D., Jiang D.-L., Nagano T., Aida T., Kataoka K. (2003) Light-harvesting ionic dendrimer porphyrins as new photosensitizers for photodynamic therapy, *Bioconjug Chem*. **14**, 58-66
95. Nowis D., Makowski M., Stokłosa T., Legat M., Issat T., Gołąb J. (2005a) Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy. *Acta biochim pol*. **52**, 339-352.
96. Nowis D., Stokłosa T., Legat M., Issat T., Jakobisiak M., Gołab J., (2005b) The influence of photodynamic therapy on the immune response, *Photodiag Photodyn Ther*. **2**, 283-298.
97. Ochsner, M. (1996) Light scattering of human skin: a comparison between zinc (II)-phthalocyanine and photofrin II. *J Photochem Photobiol B Biol*. **32**, 3-9
98. Okamoto K., Misuno M., Nakahara N., Natsume A., Yoshida J., Mori T., Hori S., Kobayashi H. (2002) Process of apoptosis induced by TNF-alpha in murine fibro-

- blast Ltk-cells: Continuous observation with video enhanced contrast microscopy. *Apoptosis*. **7**, 77-86.
99. Oleinick N.L., Morris R.L., Belichenko I. (2002) The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why and how. *Photochem Photobiol Sci*. **1**, 1-21.
100. Pagano R.E., Martin O.C. (1998) Use of Fluorescent Analogs of Ceramide to Study the Golgi Apparatus of Animal Cells. in *Cell Biology: A Laboratory Handbook*, 2nd Ed., Vol. 2, Celis JE, Ed. pp. 507-512.
101. Paquette B., Ali H., Langlois R., Brasseur N., van Lier J.E. (1988) Biological activities of phthalocyanines-VIII. Cellular distribution in V-79 Chinese hamster cells and phototoxicity of selectively sulfonated aluminum phthalocyanines. *Photochem Photobiol*. **47**, 215-220.
102. Paquette B., Boyle R.W., Ali H., MacLennan A. H., Truscott T.G., van Lier J.E. (1991) Sulfonated phthalimidomethyl aluminum phthalocyanine: The effect of hydrophobic substituents on the *in vitro* phototoxicity of phthalocyanines. *Photochem Photobiol*. **53**, 323-327.
103. Philips D. (1987) Chemical mechanisms in photodynamic therapy with phthalocyanines. *Prog Reaction Kinet*. **22**, 75-300.
104. Piette J., Volanti C., Vantieghem A., Matroule J.Y., Habraken Y., Agostinis P. (2003) Cell death and growth arrest in response to photodynamic therapy with membrane-bound photosensitizers. *Biochem Pharmacol*. **66**, 1651-1659.
105. Plaetzer K., Kiesslich T., Oberdanner C.B., Krammer B. (2005) Apoptosis following photodynamic tumor therapy : induction, mechanisms and detection, *Curr Pharm Des*. **11**, 1151- 1165

106. Plaetzer K., Kiesslich T., Verwanger T., Krammer B. (2003) The modes of cell death induced by PDT : Overview *Med Laser Appl.* **18**, 7-19.
107. Polo L., Valduga G., Jori G. and Reddi E. (2002) Low-density lipoprotein receptors in the uptake of tumour photosensitizers by human and rat transformed fibroblasts. *Int J Biochem Cell Biol.* **34**, 10-23.
108. Poot M., Gibson L.L., Singer V.L. (1997) Detection of Apoptosis in Live Cells by MitoTrackery Red CMXRos and SYTO Dye Flow Cytometry. *Cytometry.* **27**, 358-364.
109. Proskuryakov S.Y., Konoplyannikov A.G., Gabai V.L. (2003) Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Exp Cell Res.* **283**, 1-16.
110. Ramiro D.A., Manadas B.J., Carvalho A.P., Duarte C.B. (2004) Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy. *Biochim Biophys Acta*, **1704**, 59-86.
111. Ran S., Thorpe P.E. (2002) Phosphatidylserine is a marker of tumor vasculature and a potential target for cancer imaging and therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* **54**, 479-484.
112. Rancan F., Wiehe A, Nöbel M, Senge M.O., Omari S.A., Böhm F., John M., Röder B. (2005) Influence of substitutions on asymmetric dihydroxychlorins with regard to intracellular uptake, subcellular localization and photosensitization of Jurkat cells. *J Photochem Photobiol B Biol.* **78**, 17-28.
113. Reed J.C. (2003) Apoptosis-targeted therapies for cancer. *Cancer Cell.* **3**, 17-22.
114. Reid J.M., O'Neil R.G. (2000) Osmomechanical regulation of membrane trafficking in Polarized Cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **271**, 429-434.

115. Reiners J.J., Caruso J.A., Mathieu P., Chelladurai B., Yin X.-M., Kessel D. (2002) Release of cytochrome c and activation of pro-caspase-9 following lysosomal photo-damage involves bid cleavage. *Cell Death and Differ.* **9**, 934 -944
116. Rockwell S.C., Kallman R.F., Fajardo L.F. (1972) Characteristics of a serially transplanted mouse mammary tumor and its tissue-culture-adapted derivative. *J Natl Cancer Ins.* **49**, 735-749.
117. Rosenthal I., Ben-Hur E., Greenberg S., Conception-Lam A., Drew D.M., Leznoff C.C. (1988) Substituted phthalocyanines as photodynamic sensitizers. In *Oxygen Radicals in Biology and Medicine* (Simic MG, Taylor KA, Ward JF, von Sonntag C, Eds, Basic Life Science, Plenum Press, NY, vol 49, pp 467-472.
118. Sakahara H., Saga T. (1999) Avidin-biotin system for delivery of diagnostic agents. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **37**, 89-101.
119. Sharma M., Joshi P.G., Joshi N.B. (1997) Alterations in plasma membrane of glioblastoma cells by photodynamic action of merocyanine 540, *Biochim Biophys Acta.* **323**, 272-280.
120. Sharman W. M., Allen C. M., van Lier J. E. (1999) Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications, *Drug Discov Today.* **4**, 507-517
121. Sharman W.M., Allen C.M., van Lier J.E. (2000), Role of activated oxygen species in photodynamic therapy. *Methods Enzymol.* **319**, 376-400.
122. Sharman W.M., van Lier J.E., Allen C.M. (2004) Targeted photodynamic therapy via receptor mediated delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev.* **56**, 53-76.
123. Shyam K., Penketh P.G., Shapiro M., Belcourt M.F., Loomis R.H., Rockwell S., Sartorelli A.C. (1999) Hypoxia-selective nitrobenzyloxycarbonyl derivatives of 1,2-bis(methylsulfonyl)-1-(2-chloroethyl)hydrazines. *J Med Chem.* **42**, 941-946.

124. Siboni G., Weitman H., Freeman D., Mazur Y., Malik Z., Ehrenberg B. (2002) The correlation between hydrophilicity of hypericins and helianthrone: internalization mechanisms, subcellular distribution and photodynamic action in colon carcinoma cells. *Photochem Photobiol Sci.* **1**, 483-491.
125. Spikes J.D., Bommer J.C. (1986) Zinc tetrasulphophthalocyanine as a photodynamic sensitizer for biomolecules. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med.* **50**, 41-45.
126. Subbarayan M, Hafeli UO, Feyes DK, Unnithan J, Emancipator SN, Mukhtar H. (2003) A simplified method for preparation of ^{99m}Tc-annexin V and its biologic evaluation for *in vivo* imaging of apoptosis after photodynamic therapy. *J Nucl Med.* **44**, 650-656.
127. Sun J., Cecic I., Parkins C.S., Korbelik M. (2002) Neutrophils as inflammatory and immune effectors in photodynamic therapy-treated mouse SCCVII tumours. *Photochem Photobiol Sci.* **1**, 690-695.
128. Sun X., Kim J., Martell A.E., Welch M.J., Anderson C.J. (2004) *In vivo* evaluation of copper-64-labeled monooxo-tetraazamacrocyclic ligands. *Nucl Med Biol.* **3**, 1051-1059.
129. Teiten M.-H., Bezdetnaya L., Morlière P., Santus R., Guillemin F. (2003) Endoplasmic reticulum and Golgi apparatus are the preferential sites of Foscan® localisation in cultured tumour cells. *Br J Cancer.* **88**, 146-152
130. Tian H., Ali H., van Lier J.E. (2000) Synthesis of water soluble trisulfonated phthalocyanines via palladium-catalysed cross coupling reactions. *Tetrahedron Lett.* **4**, 8435-8438.

131. Urizzi P., Allen C.M., Langlois R., Ouellet R., La madeleine C., van Lier J.E. (2001) Low-density lipoprotein-bound aluminium sulfophthalocynines: Targeting tumor cells for photodynamic therapy. *J. Porphyrins Phthalocyanines*. **5**, 154-160.
132. van de Wiele C., Lahorte C., Vermeersch H., Ceyssens S., Mortelmans L., Verbruggen A.M., Steinmetz N.D., Vanderheyden J.L., Green A.M., Verbeke K. (2003) Safety, biodistribution, and dosimetry of ^{99m}Tc-HYNIC-annexin V, a novel human recombinant annexin V for human application. *J Clin Oncol*. **21**, 3483-3487.
133. van Duijnhoven F.H., Aalbers R.I., Rovers J.P., Terpstra O.T., Kuppen P.J. (2003) The immunological consequence of photodynamic treatment of cancer, a litterature review. *Immunobiol*. **207**, 105-113.
134. Van Lier J.E. (1990) Prospects of phthalocyanines as a photosensitizers for the photodynamic therapy of cancer in Future direction and applications in photodynamic therapy, Charles J Comer Editor, SPIE optical engineering press, pp107-114.
135. van Lier J.E., Spikes J.D. (1989) The chemistry, photophysics and photosensitizing properties of phthalocyanines. In *Photosensitizing Compounds: their chemistry, Biology and Clinical Use* (Edited by Dougherty, T. J., Bock, G. H., and Harnett, S.), Ciba Foundation Symposium Wiley, Chichester, 146, pp 17-32.
136. van Zandvoort M.A., de Grauw C.J., Gerritsen H.C., Broers J.L., oude Egbrink M.G., Ramaekers F.C., Slaaf D.W. (2002) Discrimination of DNA and RNA in cells by a vital fluorescent probe: lifetime imaging of SYTO 3 in healthy and apoptotic cells. *Cytometry*. **47**,226-35.
137. Vaupel P., Mayer A. (2005) Hypoxia and anemia: effects on tumor biology and treatment resistance. *Transfus Clin Biol*. **12**, 5-10.

138. Vladmirov Y.A., Opisov A.N., Klebanov G.I. (2004) Photobiological principles of therapeutic applications of laser radiation. *Biochemistry. (Moscow)* **69**, 81-90.
139. Wagner J. R., Ali H., Langlois R., Brasseur N., van Lier J.E. (1987) Biological activities of phthalocyanines VI. Photooxidation of L-tryptophan by selectively sulfonated gallium phthalocyanines: Singlet oxygen yields and effect of aggregation. *Photochem Photobiol.* **45**, 587-594.
140. Whoerle D., Iskander N., Grasczew G., Sinn H., Friedrich E.A., Maier-Borst W., Stern J., Schlag P. (1990) Synthesis of positive charge phthalocyanines and their activity in the photodynamic therapy of cancer cells. *Photochem Photobiol.* **5**, 351-356.
141. Williams H.A., Robinson S., Julyan P., Zweit J., Hastings D. (2005) A comparison of PET imaging characteristics of various copper radioisotopes. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* **32**, 1473-1480.
142. Wood B., Gibson, D.F., Tait J.F. (1996) Increased erythrocyte phosphatidylserine exposure in sickle cell disease: flow-cytometric measurements and clinical associations. *Blood.* **88**, 1873-1880.
143. Woodburn K., Stylli S., Hill J.S., Kaye A.H., Reiss J.A., Phillips, D.R. (1992) Evaluation of tumour and tissue distribution of porphyrins for use in photodynamic therapy. *Br J Cancer* **65**, 321-328.
144. Wu A.M., Yazaki P.J., Tsai S.-W., Nguyen K., Anderson A.E., McCarthy D.W., Welch M.J., Shively J.E., Williams L.E., Raubitschek A.A., Wong J.Y.C., Toyokuni T., Phelps M.E., Gambhir S.S. (2000) High-resolution microPET imaging of carcinoembryonic antigen-positive xenografts by using a copper-64-labeled engineered antibody fragment. *PNAS.* **97**, 8495-8500.

145. You Y., Gibson S.L., Hilf R., Davies S.R., Oseroff A.R., Roy I., Ohulchanskyy T.Y., Bergey E.J., Detty M.R. (2003) Water soluble, core-modified porphyrins. 3. Synthesis, photophysical properties, and *in vitro* studies of photosensitization, uptake, and localization with carboxylic acid-substituted derivatives. *J Med Chem.* **46**, 3734-3747.
146. Zeisler S.K., Pavan R.A., Orzechowski J., Langlois R., Rodrigue S., van Lier J.E., (2003) Production of ^{64}Cu on the Sherbrooke TR-PET cyclotron. *J. Radioanalytical Nuc. Chem.* **257**, 175-177.
147. Zheng G., Potter W.R., Camacho S.H., Missert J.R., Wang G., Bellnier D.A., Henderson B.W., Rodgers M.A., Dougherty T.J. Pandey R.K. (2001) Synthesis, photophysical properties, tumor uptake, and preliminary *in vivo* photosensitizing efficacy of a homologous series of 3-(1'-alkyloxy)ethyl-3-devinylpurpurin-18-N-alkylimides with variable lipophilicity. *J Med Chem.* **44**, 1540-1559.
148. Zimmermann K., Grunberg J., Honer M, Ametamey S., Schubiger P.A., Novak-Hofer I. (2003) Targeting of renal carcinoma with $^{67/64}\text{Cu}$ -labeled anti-L -CAM antibody chCE7: selection of copper ligands and PET imaging. *Nucl Med Biol.* **30**, 417-427.